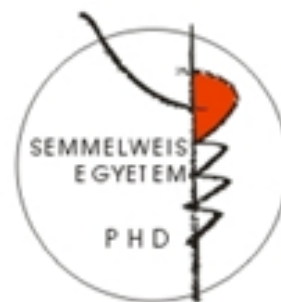


**EZH2 és mikroRNS expressziós vizsgálatok
pszeudofollikuláris mintázatot mutató
krónikus lymphocytás leukémiás nyirokcsomókban**

Doktori értekezés

Dr. Szurián Kinga



Semmelweis Egyetem

Patológia Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Reiniger Lilla, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Mikala Gábor, Ph.D, klinikai főorvos

Dr. Nagy Zsolt, Ph.D, egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottság elnöke:

Dr. Schaff Zsuzsanna, Ph.D, MTA doktora

Komplex vizsga bizottság tagjai:

Dr. Tóth Erika, Ph.D, oszt.vez. főorvos

Dr. Patócs Attila, Ph.D, MTA doktora

Budapest

2018

TARTALOMJEGYZÉK

I. IRODALMI HÁTTÉR	8
I.1. Krónikus lymphocytás leukemia.....	8
I.1.1. Előfordulás, klinikai jellegzetesség, genetikai hajlam	8
I.1.2. Morfológiai jellegzetességek	10
I.1.3. Immunfenotípus	12
I.1.4. Genotípus	12
I.1.5. Diagnosztikai kritériumok	14
I.1.6. A CLL stádiumbeosztása	14
I.1.7. Prognózis, prognosztikai és prediktív faktorok	15
I.1.8. A CLL progressziója.....	17
I.1.9. A CLL kezelése.....	18
I.1.10. A CLL eredete.....	21
I.1.11. A pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL jellemzői, prognosztikai jelentősége	22
I.2. A mikroRNS-ek	25
I.2.1. A mikroRNS-ek és funkciójuk.....	25
I.2.2. A mikroRNS-ek bioszintézise és hatásmechanizmusa	25
I.2.3. A miRNS-ek szerepe a daganatok kialakulásában.....	27
I.2.4. A miRNS-ek szerepe a daganatok elleni terápiában.....	28
I.2.5. A mikroRNS-ek szerepe a CLL kialakulásában és progressziójában.....	29
I.3. Enhancer of zeste 2.....	32
I.3.1. Az EZH2 szerepe a biológiai folyamatokban	32
I.3.2. Az EZH2 szerepe a normál hematopoézisben	33
I.3.3. Az EZH2 szerepe a lymphomagenezisben	34
I.3.4. Az EZH2 szerepe a CLL-ben.....	34
I.3.5. Az EZH2 terápiás jelentősége.....	35
II. CÉLKITŰZÉSEK	38
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	39
III.1 Beteganyagok.....	39
III.2 MikroRNS expresszió vizsgálat kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval.....	39
III.2.1. Lézermikrodisszekció.....	40

III.2.2. RNS izolálás.....	41
III.2.3. Reverz transzkripció.....	42
III.2.4. Preamplifikáció	42
III.2.5. Kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció.....	45
III.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok	48
III.4 Az <i>IgHV</i> és <i>EZH2</i> gének szekvencia vizsgálata	50
III.4.1. DNS izolálás.....	50
III.4.2. Az <i>IgHV</i> és <i>EZH2</i> gének PCR amplifikációja.....	51
III.4.5. A polimeráz láncreakció során nyert termék detektálása.....	53
III.4.6. A polimeráz láncreakció során nyert termék tisztítása.....	53
III.4.7. A szekvenáló reakció	54
III.4.8. A szekvenáló reakció termékeinek tisztítása.....	55
III.4.9. Kapilláris elektroforézis és szekvencia analízis	55
III.5 Statisztikai analízis.....	56
IV. EREDMÉNYEK.....	57
IV.1. MikroRNS expresszió a CLL/SLL-es nyirokcsomók pszeudofollikulusaiban és interfollikuláris tereiben	57
IV.2. Az <i>EZH2</i> fehérje, valamint az <i>EZH2</i> transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expressziója CLL/SLL-es nyirokcsomók pszeudofollikulusaiban és interfollikuláris tereiben.....	58
IV.3. Az <i>EZH2</i> gén aktiváló mutációinak analízise	61
IV.4. Az <i>IgHV</i> gén szekvencia analízise	61
IV.5. A mikroRNS-ek, illetve az <i>EZH2</i>, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése az <i>IgHV</i> mutációs státusszal	65
IV.6. A mikroRNS-ek, illetve az <i>EZH2</i>, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése a kromoszóma eltérésekkel.....	65
V. MEGBESZÉLÉS	67
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	76
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	77
VIII. SUMMARY	78
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	79
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	107
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A: adenin

AIHA: autoimmun hemolítikus anémia

AMO: anti-miRNA oligonukleotid

ATM: Ataxia Teleangiectasia mutált

BCL-2: B-cell lymphoma 2

BCL-6: B-cell lymphoma 6

BCR: B-sejt receptor

BIRC3: Baculoviral IAP Repeat Containing 3

B-PLL: B-sejtes prolymphocytás lymphoma

BTK : Bruton tirozinkináz

C: citozin

CCND1: ciklin D1 fehérjét kódoló gén

CD: „cluster of differentiation”, sejt differenciálódási antigének

CDK1: ciklin-dependens kináz 1

CDK2: ciklin-dependens kináz 2

cDNS: komplementer DNS

CG: centrum germinatívum

CLL-IPI: international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia

CLL/SLL: krónikus lymphocytás leukemia/ kis lymphocytás lymphoma

CNV: copy number variation

CSV: csontvelő

DAB: diaminobenzidin

DCCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8

del: delécio

DLBCL: diffúz nagy B-sejtes lymphoma

DN-áz: deoxyribonukleáz

DNS: deoxiribonukleinsav

DZNep: 3-deazaneplanocin A

EBV: Epstein-Barr vírus
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
EED: embryonic ectoderm development
EID: early mouse embryogenesis
EZH2: Enhancer of zeste 2
FFPE: formalin fixált paraffinba ágyazott
FISH: fluoreszcens in-situ hibridizáció
FL: follikuláris lymphoma
g: nehézségi gyorsulás
H3K27: histone H3 lysine 27
HE: hematoxilin eozin
HL: Hodgkin lymphoma
HMTáz: hiszton metiltranszferáz
HOTAIR: HOX antisense intergenic RNA
HSC: hemopoetikus őssejt
IF: interfollikuláris terek
Ig: immunglobulin
IgHV: immunglobulin nehéz lánc gén variábilis régiója
IMGT/V-QUEST: International ImMunoGeneTics Information System
iwCLL: International Workshop of Chronic Lymphocytic Leukemia
Ki-67: proliferációs marker
LDT: lymphocyte doubling time
lncRNA: long non-coding RNA
LOH: loss of heterozygosity, heterozigótaság elvesztése
M: mutált
MBL: monoklonális B-lymphocytosis
MGG: May-Grünwald-Giemsa
miR: mikroRNS
miRNS: mikroRNS
mRNS: messenger RNS
MM: Master Mix
MZ: marginális zóna

NHL: non-Hodgkin lymphoma

NM: nem mutált

NOTCH1: Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) gén

NOXA: PMAIP1, Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

PCR: polimeráz láncreakció

PF: pszeudofollikulus

PI3K: foszfatidil inozitol 3 kináz

pRb: foszforilált Retinoblastoma

PRC2: Polycomb repressive complex 2

PTEN: foszfatáz tenzin

PV: perifériás vér

qRT-PCR: kvantitatív valós-idejű (real-time) PCR

Ras: Rat sarcoma, monomer G-fehérje család

Rb: retinoblastoma

RNS: ribonukleinsav

RNU-48: kis magi RNS 48

RT: Richter transzformáció, Richter szindróma

SAM: S-adenosylmethionine

SDS: natrium-dodecil-szulfát

SET: Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax

SF3B1: Splicing factor 3B subunit 1

shRNS: short hairpin RNA, kis hajtű RNS

siRNS: small interfering RNA, rövid interferáló RNS

SMIR: small molecular inhibitor of specific miRNA

SNF5: SMARCB1-et is tartalmazó protein komplex

SNP: single nucleotid polymorphism

snRNS: small non-coding RNS, kis nem-kódoló RNS

SR: Sternberg-Reed

Src: hiányos, nem-receptor tirozin-kináz család

SUZ12: suppressor of zeste 12 homolog

T: timin

TAE: Tris-acetát-EDTA

TBS: Tris puffereelt sóoldat

TE: Tris-EDTA

TE oldat: 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA

TGF-béta: transzformáló növekedési faktor béta

TP53: tumor protein p53

TSR: template suppression reagent

U6 snRNS: kis nem-kódoló RNS

UTR: untranslated region

VASH1: Vasohibin-1 gén

VEGF: vascular endothelial growth factor

WHO: World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

WIG-1: *ZMAT3*, *Zinc Finger Matrin-type 3* gén

ZAP-70: zéta-lánc-asszociált fehérje 70

Δ Ct: delta CT

I. IRODALMI HÁTTÉR

I.1. Krónikus lymphocytás leukemia

A krónikus lymphocytás leukemia (CLL) monomorf, kicsi, kerek vagy ovális morfológiájú atípusos érett B-sejtekből, valamint az ezen sejtek között megjelenő nagyobb méretű prolymphocytákból és paraimmunoblastokból álló proliferáció a perifériás vérben (PV), csontvelőben (CSV), lépben és nyirokcsomókban. A World Health Organization (WHO) osztályozása alapján az érett B-sejtes non-Hodgkin lymphomák közé tartozó, alacsony malignitású lymphoma [1]. A korábbi T-sejtes CLL-t az újabb osztályozás alapján T-sejtes prolymphocytás leukémiának nevezzük [2]. A kis lymphocytás lymphoma (SLL) a CLL eltérő megjelenési formája, ahol a CLL-es sejtek a nyirokcsomókat és a lépét infiltrálják, de a csontvelőt és a perifériás vért nem. Lymphadenomegalia és splenomegalia megfigyelhető, de a perifériás vérben kevesebb, mint $5 \times 10^9/L$ CLL-fenotípusú lymphocytá van jelen és csontvelő-infiltráció hiányában a betegeknek nincs citopéniája [1].

I.1.1. Előfordulás, klinikai jellegzetesség, genetikai hajlam

A CLL a „nyugati országok” felnőtt lakosságának leggyakoribb leukémiás megbetegedése, az összes non-Hodgkin lymphoma mintegy 7%-a. Az incidencia 2-6 eset/ 100 000fő/ év. Az incidencia az életkorral nő és a 65 évnél fiatalabbak körében is emelkedést mutat az újonnan diagnosztizált esetek száma [1-3]. Az Amerikai Egyesült Államokban évente 15 000 új esetet diagnosztizálnak és a CLL okozta halálesetek száma mintegy évi 4500-ra tehető. Az átlagéletkor az első diagnóziskor 67 és 72 év közötti. Férfi predominancia megfigyelhető, a férfi : nő arány 1.7 : 1. Az átlagéletkor növekedésének köszönhetően a jövőben az incidencia, prevalencia és mortalitás növekedése várható. A fiatalabb generációban a diagnózis gyakoriságnövekedésének hátterében a gyakoribb rutin vérvizsgálat állhat [1, 4]. Hazánkban az incidencia 4,2/ 100 000 fő /év, így átlagosan 420 új esetet diagnosztizálnak évente. Az átlagéletkor a diagnóziskor 72 év. Az incidencia hazánkban is nő az életkorral, 80 év felett 30/100 000/év [5]. A betegek kevesebb mint 10%-a 55 évnél fiatalabb [3].

A betegség klinikai megjelenése és lefolyása igen eltérő lehet az egyes esetekben. A betegek mintegy 70%-a [6] a diagnózis időpontjában tünetmentes; kis

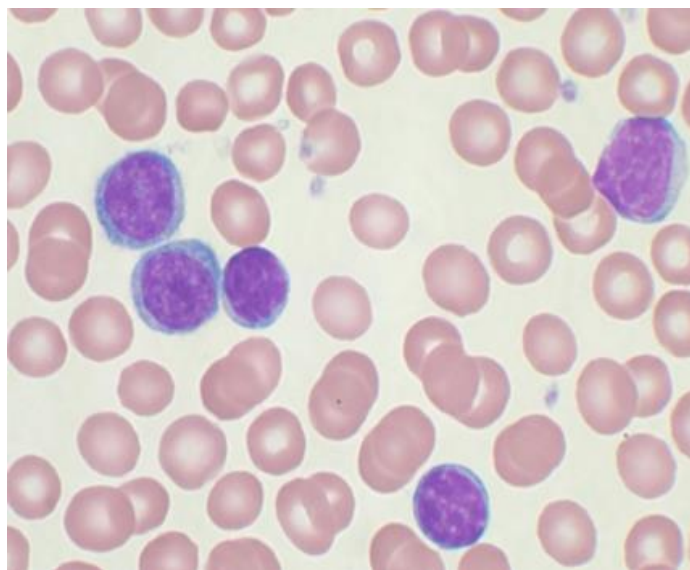
százalékban nem specifikus tünetek jelentkeznek, mint pl. fáradtság, étvágytalanság, súlyvesztés vagy éjszakai izzadás. Fájdalmatlan, tömött nyirokcsomó megnagyobbodás kezdetben mintegy 50%-ban észlelhető, de a betegség előrehaladtával minden betegben megjelenik. A generalizált lymphadenopathia először a nyaki és supraclavicularis régiókat érinti [7]. Képzalkotó vizsgálattal (mellkas röntgen, hasi ultrahang ill. mellkasi-hasi computer tomográfia) kezdetben az esetek mintegy 25%-ában mediastinális és 10%-ában hasi nyirokcsomó megnagyobbodás igazolható [6]. Máj- és lépmeagnagyobbodás a kezdeti stádiumban nem jellemző. A megnagyobbodott hasi nyirokcsomók és belső szervek hasi teltségérzést okoznak, míg a nagy mediastinális nyirokcsomók következtében terhelési nehézlégzés jelentkezhet. Bőrfelenségek (viszketés, urticaria, purpura, herpes zoster és simplex, mycosis, gócos bőrinfiltrátum) szintén nem gyakoriak, azonban idős betegnél az említett bőrfelenségek megjelenése esetén mindig gondolni kell a háttérben CLL fennállására. Mikulicz-szindróma (parotis duzzanat és könnymirigy érintettség) ritka, de előfordulhat. A fertőzés a granulocitopénia és antitest hiány következtében kialakuló leggyakoribb szövődmény és egyben halálok is [8]. Autoimmun hemolitikus anémia (AIHA), illetve autoimmun thrombocytopenia is kísérheti ritkán a CLL-t, ennek oka jelenleg nem ismert [6, 9]. A laboreltérések közül vezető tünet az állandó leukocitózis magas, 70-95% közötti lymphocyta aránnyal és állandó, abszolút, $>10\,000/\text{ml}$ feletti lymphocytózissal [6]. M-komponens a szérumban ritkán megjelenhet [1, 6]. A CLL-es betegeknek a másodlagos daganat kialakulás kockázata is emelkedett. Leggyakrabban bőr-, tüdő-, vastagbél- vagy méhnyakrák alakul ki [10]. A betegség mintegy 5-10%-ban magas malignitású lymphomába transzformálódik (részletesen ld. az 1.9 alfejezetben) [11]. A betegség egyetlen eddig ismert rizikófaktora a családi halmozódás. A CLL-es betegek családjában 6-9-szeres a rizikó a kórkép megjelenésére. A familiáris forma korábbi életkorban jelentkezik [3].

A 2008-as WHO 2016-os revíziója ún. „low-count” (alacsony sejtszámú) és „high-count” (magas sejtszámú) monoklonális B-sejtes lymphocytózist (MBL) különböztet meg. „Low-count” MBL esetén definíció szerint $<0,5 \times 10^9/\text{L}$ a lymphocyta-szám, ez azonban nem tekinthető prekursor lézióknak. CLL-be történő progressziója rendkívül ritka – ha egyáltalán előfordul –, ezért követést nem igényel. A „high-count” MBL fenotípus és genetikai/molekuláris tulajdonságai a Rai 0 stádiumú betegséghez nagyon hasonlítanak, ezért ezeknek a betegeknek éves követése szükséges [4, 12].

A 40 évnél idősebbek körülbelül 3,5%-ában figyelhető meg CLL-re jellemző fenotípusú monoklonális B-sejtes lymphocytózis [1]. A CLL esetek mintegy 10%-a familiáris és ezen esetekben az első- és másodfokú rokonok között a B-sejtes lymphocytózis 40 éves kor előtti előfordulása mintegy 15%; azaz több mint háromszor gyakoribb az átlag populációhoz képest. A sporadikus CLL-ben szenvedő betegek rokonai között is 15% körüli a MBL előfordulása, azonban ezen esetekben későbbi életkorban, 60 év felett diagnosztizálják. Familiáris CLL kapcsán 20 génben találtak egy pontos nukleotid polimorfizmust (single nucleotid polymorphism, SNP), mely a betegséggel összefüggésbe hozható. Ezen SNP-k közül hatról feltételezik, hogy a MBL kockázatát is növelik [13].

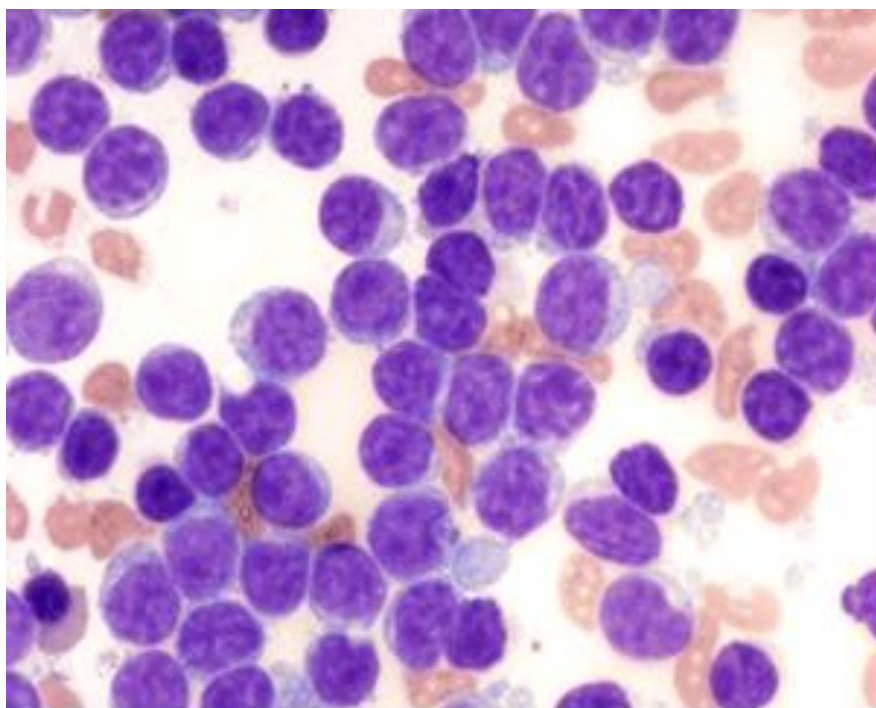
1.1.2. Morfológiai jellegzetességek

A CLL-es betegek perifériás vérből származó keneteiken abszolút lymphocytózis igazolható. Igen nagy számban vannak jelen kisméretű, keskeny citoplazmájú, kerek magvú lymphocyták, ahol a kromatin rögös, a magban magvacska nem látható (1. ábra). Széles, világos citoplazmával és prominens magvacskával rendelkező prolymphocyták csak elvétve azonosíthatóak. A mechanikailag károsodott lymphocyták maradványai, az ún. Grumprecht-rögök gyakran jelen vannak. Az atípusos CLL ritka, ilyenkor a keneteken igen nagyméretű, hasadt vagy behúzódasokat tartalmazó sejtmagokkal rendelkező lymphocyták figyelhetőek meg.



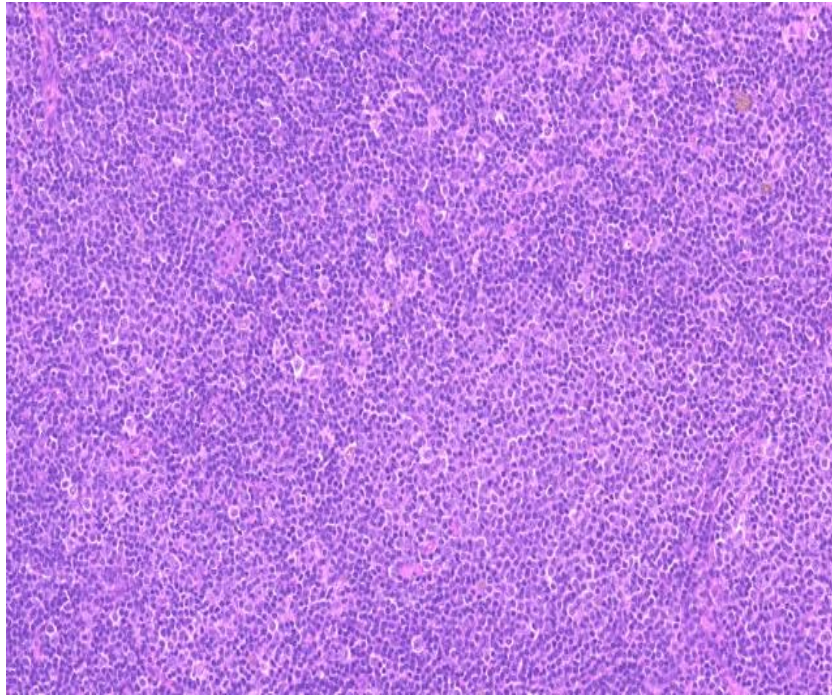
1. ábra. CLL, perifériás vér kenet (MGG, 600x). Kis méretű, keskeny citoplazmájú, kerek magvú CLL sejtek rögös kromatinnal. Magvacska nem látható.

A csontvelőből származó aspirációs mintán a perifériás vérből származó keneteken látható tumorsejteknek megfelelő morfológiájú sejtek vannak jelen (2. ábra).



2. ábra. CLL, csontvelőkenet (MGG, 600x). A keneten túlnyomó többségben vannak jelen a CLL sejtek.

A csontvelő infiltráció mértéke 10-90% között változik. Az infiltráció lehet noduláris, interstitiális vagy diffúz. A nyirokcsomókból származó mintákban az eredeti follikuláris mintázat elmosódott, helyette kis CLL-es lymphocyták diffúz infiltrációja azonosítható (3. ábra). Az infiltrátumban lazább magszerkezetű sejtekből felépülő ún. pszeudofollikulusok (PF) is megjelennek, melyek a CLL/SLL proliferációs zónáinak felelnek meg. A májban a portális terek, míg a lépben a vörös pulpa infiltrációja jellemző [10].



3. ábra. CLL, nyirokcsomó (HE, 50x). A CLL sejtek diffúz infiltrációja látható, a világosabb területek a pszeudofollikulusok.

1.1.3. Immunfenotípus

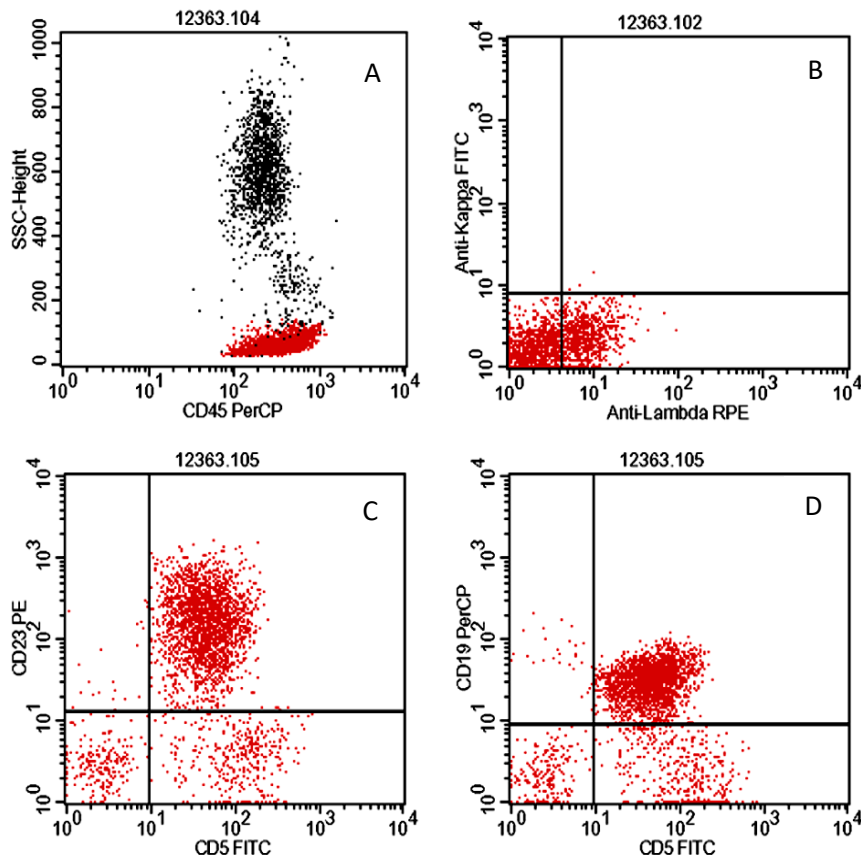
A CLL/SLL sejtei CD20, CD22, CD5, CD19, CD79b, CD23 és CD43 markereket hordoznak [1]. A zéta-asszociált protein-70 (ZAP-70) expressziója változó mértékű. Sejtfelszíni monoklonális Ig expresszió szintén kimutatható az esetek többségében [10]. A jellegzetes immunfenotípus meghatározása perifériás vérből, illetve csontvelő aspirációs mintából áramláscitometriai mérésekkel (4. ábra), míg nyirokcsomó biopsziás mintán immunhisztokémiai vizsgálatokkal történik.

1.1.4. Genotípus

A genotípust tekintve a CLL heterogén betegségcsoport, a kialakulás hátterében komplex genetikai eltérések állnak. Fluoreszcens in-situ hibridizációs (FISH) vizsgálattal az esetek kb. 80%-ában mutatható ki valamilyen citogenetikai eltérés. Az esetek mintegy 50%-ában a 13q14.3 deléciója, kb. 20%-ában a 12-es kromoszóma triszómiája igazolható. Ezen felül gyakori eltérés a 17p13, 11q22-23 és a 6q21 deléciója. A 13q14.3 régióban a *miR-16-1* és *miR-15a* mikroRNS, míg a 11q22-23

régióban az *ATM*, és a 17p13 régióban a *TP53* gén lokalizálódik [1]A CLL további genetikai jellemzője, hogy az expresszált immunglobulin nehéz lánc gén variábilis régiójában (*IgHV* gén) mutáció igazolható. A gén lehet nem mutált is, azonban az esetek 50-60%-ában szomatikus mutációt hordoz. A mutációs státusznak prognosztikai jelentősége van (ld. 1.1.7 alfejezet) [14].

CLL-es betegek perifériás vérmintáiban 8 gén (*TP53*, *ATM*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *XPO1*, *MYD88*, *DDX3X*, *PTPN6*) multiplex PCR (polimeráz lánc reakció) alapú új generációs szekvenálással végzett vizsgálatban 102 különböző, de többször előforduló mutációt határoztak meg. Érdekes, hogy valamennyi esetben a mutáció jelenléte rosszabb prognózissal társult [15, 16].



4. ábra. CLL, áramlás citometria (perifériás vér). **A:** CD45/SSC diagram. A reaktív és a CLL-es lymphocyták (piros) elkülönülnek a granulocytáktól és monocytáktól (fekete). **B-D:** További vizsgálatok a piros színnel ábrázolt sejtpopuláción belül. **B:** A CLL-es sejtek lambda-könnyű-lánc monoklonális reakciót mutatnak, az expresszió intenzitása alacsony (jobb alsó kvadráns). **C:** A leukaemiás sejtek CD5 és CD23 pozitívak (jobb felső kvadráns). **D:** A leukaemiás sejtek CD5 és CD19 pozitívak (jobb felső kvadráns).

1.1.5. Diagnosztikai kritériumok

A CLL diagnózis felállításához a nemzetközi ajánlások, konszenzusok (International Workshop on CLL, iwCLL) alapján elengedhetetlen feltétel több, mint $5 \times 10^9/\text{L}$ CLL-fenotípusú lymphocytá 3 hónapnál hosszabb ideig kimutatható a perifériás vérben [2]. A keringő B-sejtek klonális eredetét áramlás citometriai vizsgálattal kell igazolni. Legtöbbször rutin vérvétel kapcsán derül fény az atípusos B-lymphocyták jelenlétére a perifériás vérben. Előfordul, hogy más betegség kapcsán végzett fizikális vizsgálat során diagnosztizálják a lép és/vagy nyirokcsomó megnagyobbodást. Néha klinikai tünetek, mint pl. B-tünetek (anémia, thrombocytopenia, láz) keltik fel a figyelmet. A CLL diagnózisához nyirokcsomó-, illetve csontvelő-biopszia nem szükséges [3, 6]. Organomegália, citopénia és B-tünetek hiányában, amennyiben a perifériás vér monoklonális B-sejt szaporulata kevesebb, mint $5 \times 10^9/\text{L}$, monoklonális B-lymphocytosisról beszélünk [4]. SLL esetén a perifériás vérben kevesebb, mint $5 \times 10^9/\text{L}$ CLL-fenotípusú lymphocytá van jelen [1]. A diagnózis felállításához ez esetben nyirokcsomó biopszia szükséges.

Differenciáldiagnosztikai szempontból a CLL-t el kell különíteni egyéb perifériás lymphocytá-szaporulattól, nyirokcsomó megnagyobbodás esetén nyirokcsomó biopsziás mintából szövettani vizsgálattal reaktív elváltozásoktól, ill. köpenysejtes lymphomától, hajas sejtes leukémiától, lymphoplasmocytás lymphomától és T-sejtes non-Hodgkin lymphomától (NHL) [10].

1.1.6. A CLL stádiumbeosztása

A CLL klinikai stádiumbeosztása a prognózis és kezelés szempontjából fontos. A CLL klinikai stádiumának meghatározására 2 beosztás terjedt el. A Rai, illetve módosított Rai beosztást inkább az Egyesült Államokban használják, míg a Binet beosztás Európában terjedt el (1. Táblázat). Előbbi főként a hematológiai eltéréseken alapul, míg utóbbi alapja inkább a betegség kiterjedése [6, 17, 18].

Megegyezés alapján a következő területek egy régiónak számítanak: (1) fej-nyak régió, mely a Waldeyer-gyűrűt is magába foglalja, függetlenül attól, hogy hány területen vannak megnagyobbodott nyirokcsomók; (2) axilla (mindkét oldali axilla érintettsége is

egy régiónak számít); (3) ágyéki régió (mindkét oldali), mely magába foglalja a felszínes femoralis nyirokcsomókat is [2].

1. Táblázat. CLL staging és prognózis

RAI-STÁDIUM	MÓDOSÍTOTT RAI-STÁDIUM (RIZIKÓ STÁTUSZ)	JELLEMZŐK	PROGNÓZIS
0	alacsony	lymphocytosis, lymphocyta vérben > 15 000/μl és >40% lymphocyta a csontvelőben	átlagos túlélés >10év
1	közepes	0 stádium plusz nagy nyirokcsomók	átlagos túlélés >8év
2	közepes	0-1 stádium plusz hepato-splenomegalia	átlagos túlélés >8év
3	magas	0-2 stádium plusz anémia (Hb < 110 gl)	átlagos túlélés 6,5év
4	magas	0-2 stádium plusz thrombocitopénia (thr < 100 000/μl)	átlagos túlélés 6,5év
BINET-STÁDIUM	JELLEMZŐ		PROGNÓZIS
A	Hb > 100 g/l, thr >100G/l és <3 nyirokcsomó-régió érintett		átlagos túlélés >10év
B	Hb > 100 g/l, thr >100G/l és >3 nyirokcsomó-régió érintett		átlagos túlélés >8év
C	Hb < 100 g/l, thr < 100G/l és bármely nyirokcsomó-régió érintett		átlagos túlélés 6,5év

1.1.7. Prognózis, prognosztikai és prediktív faktorok

A RAI 0/BINET A stádiumú betegek átlagos túlélése 10 évnél több. RAI 2-3/BINET B stádium esetén legalább 8 éves túlélés várható, míg RAI 4-5/BINET C stádiumban a betegek várható élettartama csupán 6,5 év [2, 17].

A betegek prognózisának megítélésében a stádiumbeosztás mellett a citogenetikai eltérések, *IgHV* gén mutációs státusza, *TP53* mutáció, illetve a morfológiai típus a meghatározóak. A citogenetikai eltérések kimutatása FISH vizsgálattal történik. A kromoszóma eltérések közül a 13q deléción az önállóan megjelenő kromoszóma eltérések közül a leggyakoribb, az esetek mintegy 55%-ában áll fenn. Az izolált 13q14 deléción jó prognózist jelent. A 11-es kromoszóma hosszú karjának delécióját az esetek

mintegy 25%-ában, és a naív, nem kezelt betegek mintegy 10%-ában van jelen. A del11q-t hordozó betegekre jellemző a kifejezett nyirokcsomó megnagyobbodás, gyors progresszió és rövidebb túlélés. A 17-es kromoszóma rövid karjának deléciója a kezeletlen, naív esetek mintegy 5-8%-ában igazolható. A deléció mindig magába foglalja a 17p13 régiót, ahol a *TP53* gén lokalizálódik. A del17p-t hordozó betegek kemoterápia rezisztensek még addicionális anti-CD20 kombinált terápia esetén is. A 12-es kromoszóma triszómiája az esetek kb. 10-20%-ában igazolható. Patogenetikai szerepe a CLL-ben nem ismert és prognosztikai szerepe is kérdéses [2]. A 6q deléció jelenlegi tudásunk szerint prognosztikai szereppel nem rendelkezik [19].

Az *IgHV* gén mutációs státuszát tekintve a mutációval járó esetek prognózisa jobb. Mutáció a betegek mintegy 50-60%-ában mutatható ki [14]. Az *IgHV* gén mutációs státusza mellett a ZAP-70 és a CD38 protein expressziója is fontos a prognózis megítélésében. Mind a tirozin kináz aktivitású ZAP-70 protein, mind a CD38 expressziója összefügg az *IgHV* gén mutációs státuszával. Ezen fehérjék expressziójának megjelenése rosszabb prognózist jelent [14, 20, 21].

A legújabb vizsgálatok alapján – terápiás szempontból – az egyik legfontosabb prognosztikai tényező a *TP53* mutációs státusz. Az igazolt del17p-vel járó esetek >80%-ában a másik *TP53* allél mutációja is igazolható [2]. A *TP53* mutáció igen rossz prognózissal társul [22]. Del17p hiányában ugyanakkor *TP53* mutáció ritkán fordul elő. CLL-ben a *TP53* mutációja komplex genetikai eltérésekkel társul, mely felveti a „károsodott DNS sejtválasz” (DDR – DNA damage response) kapcsán az ún. mutátor fenotípus lehetőségét CLL-ben [2].

Teljes genomális DNS metilációs vizsgálatok alapján a CLL-ben három epigenetikai alcsoport különíthető el: naív B-sejtekre emlékeztető, memória B-sejtekre emlékeztető és intermedier jellegű CLL. A naív B-sejtekre emlékeztető CLL csoportban többnyire nem mutált az *IgHV* gén, a másik két csoportban többségében mutált. Az intermedier csoportba tartozó esetek lefolyása agresszívabb.

Az utóbbi években teljes exon szekvenálással a CLL csaknem teljes genetikai háttere feltérképezésre került. A fent említett kromoszóma eltérések mellett 44 további, többször előforduló mutációt és 11 visszatérő szomatikus gén kópiaszám eltérést (CNV – copy number variation) azonosítottak [23]. A talált mutációk közül néhánynak potenciális klinikai jelentősége van, a *TP53* mellett pl. a *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM* és *BIRC3* gén mutációinak [1] [4].

A felsoroltak mellett prognosztikai szerepe lehet a pszeudofolikuláris mintázatnak is. Az agresszívebb lefolyású esetekben szövettanilag nagyméretű pszeudofolikulusok láthatóak, melyek egy 20x látótérnél nagyobbak, vagy egymással összefolynak [1].

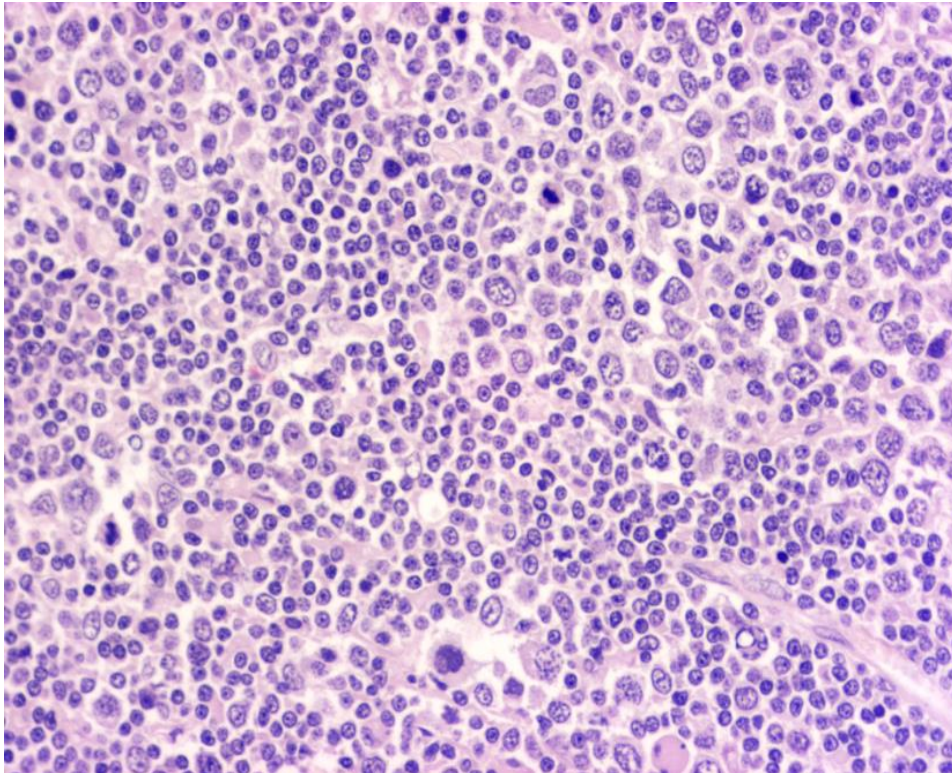
A nemzetközi CLL munkacsoport (International CLL-IPI working group; CLL-IPI: international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia) a betegség genetikai, biológiai és klinikai tulajdonságait együttesen figyelembe véve a CLL osztályozásánál olyan, egymástól számos tulajdonságban eltérő rizikócsoportokat hozott létre, melynek segítségével a betegek könnyebben választhatók be klinikai vizsgálatokba [24]. A munkacsoport 8 különböző, fázis III. klinikai vizsgálatba beválasztott kezeletlen betegeket vizsgált. 5 könnyen vizsgálható paraméter –*TP53* deléció/mutáció, *IgHV* mutációs státusz, β_2 mikroglobulin koncentráció, klinikai stádium és életkor a diagnóziskor- adatait összevetve 4 szignifikánsan különböző prognózisú –alacsony, közepes, magas és igen magas kockázatú- csoportba sorolja a betegeket.

1.1.8. A CLL progressziója

A CLL a betegek mintegy 5-30%-ában agresszívebb formába transzformálódik. A transzformáció leggyakrabban a nyirokcsomókban, ritkán a csontvelőben alakul ki. A transzformáció következtében a betegek várható élettartama jelentősen lecsökken [10]. A betegség időbeni előrehaladtával egyre több nagyméretű, aktívan proliferáló tumorsejt detektálható. A nyirokcsomókban és a csontvelőben ezekből a nagy sejtekből felépülő, egymással összefolyó ún. pszeudofolikulusok jelennek meg. Ezzel egyidőben a perifériás vérben növekvő számban vannak jelen prolymphocyták. A B-sejtes prolymphocytás lymphomába (B-PLL) történő transzformáció azonban szerencsére igen ritka.

A leggyakoribb transzformációs forma, mely a betegek mintegy 2-8%-ában alakul ki, az ún. Richter transzformáció (Richter szindróma, RT), melynek során a CLL diffúz nagy B-sejtes lymphomába (DLBCL) transzformálódik (5. ábra) [1]. A transzformáció során a betegek nyirokcsomói hirtelen jelentős mértékben megnagyobbodnak, emellett általában súlyvesztés is bekövetkezik. A RT extranodálisan is megjelenhet [25]. A transzformált DLBCL-es betegek átlagos túlélése 1 évnél kevesebb. Ezen esetekben a *IgHV* gén legtöbbször nem mutált [1].

Kevesebb mint 1%-ban a transzformáció során klasszikus Hodgkin lymphoma (HL) alakul ki. Ezen betegek többségében korábban az *IgHV* gén mutációja kimutatásra került. CLL-es betegek Epstein-Barr vírus (EBV) pozitív Hodgkin lymphomájaa esetén az EBV-pozitív Sternberg-Reed (SR) sejtek általában függetlenek a CLL-es klóntól. Ugyanakkor néhány CLL-es betegben elszórtan igazolhatóak SR-sejtek, melyek egy része EBV-pozitív. Ezeket az eseteket a diagnosztika során HL-val nem szabad összetéveszteni. Érdeemes megjegyezni azt is, hogy fludarabin terápia után EBV-asszociált lymphoproliferatív betegség kialakulhat, és a betegségcsoportba az EBV-pozitív HL is beletartozik [1, 10, 26]. Kis százalékban akut lymphoblastos leukémiába történő transzformáció is előfordul, mely kifejezetten agresszív lefolyással jár [10].



5. ábra. Richter transzformáció (HE, 100x). A CLL-es lymphocyták és a diffúz nagy B-sejtes lymphoma sejteinek keveredése látható nyirokcsomóból származó mintában.

1.1.9. A CLL kezelése

A betegek döntő többségében a diagnózis felállításának időpontjában nincs szükség kezelésre. A CLL lefolyása igen változatos, a betegek nagy részénél kezelést

igénylő aktív szakok váltakoznak kezelést nem igénylő inaktív szakaszokkal. Néhány betegnél soha nem jelentkezik aktív szak. A daganatellenes terápia mellett a fertőzések, anémia és thrombocytopenia miatt a betegek többsége szupportív kezelést is igényel [8]. A betegek kezelésében a Hallek-féle 2008-as iwCLL (International Workshop of Chronic Lymphocytic Leukemia) kritériumok a meghatározóak [2].

Általánosságban elmondható, hogy az újonnan diagnosztizált, tünetmentes, RAI 0/BINET A stádiumú betegek mindaddig, amíg progresszió nem figyelhető meg, csupán szoros követést igényelnek. Számos tanulmány igazolta, hogy a fent említett betegségcsoportban az alkiláló szerek alkalmazása a túlélést nem javította. Kezdeti, tünetmentes stádiumban alkalmazott chloarambucil kezelés nem befolyásolta sem a betegségmentes túlélést, sem az össz túlélést. Ugyanígy stádiumú betegekben intermittáló kombinált chlorambucil-prednisolon terápia mellett lassabb volt a progresszió, de az össz túlélés nem változott a kezeletlen csoporthoz képest. [27-29].

A módosított RAI stádium szerint közepes- és magas rizikójú, BINET B vagy C stádiumú betegek általában kezelést igényelnek. RAI közepes rizikójú, BINET B stádiumú betegek egy részénél a szoros követés elegendő lehet, mindaddig, amíg nincs progresszió, ill. a beteg tünetmentes.

Aktív betegségről beszélünk, ha a következő kritériumok közül legalább egy teljesül:

- progrediáló csontvelő elégtelenség, anémia és/vagy thrombocitopénia, vagy a meglévő vérkép-eltérések romlása
- jelentős (a bordaívét legalább 6 cm-rel meghaladó) vagy progrediáló vagy tüneteket okozó lépmegegyobbodás
- jelentős (hosszirányban legalább 10 cm átmérőjű) vagy progrediáló vagy tüneteket okozó nyirokcsomó-megnagyobbodás
- progrediáló lymphocytózis infekció nélkül (abszolút lymphocyta szám 2 hónap alatt >50%-os növekedése vagy a lymphocyta megkettőződési idő (LDT, lymphocyte doubling time) < 6 hónap)
- autoimmun hemolitikus anémia és/vagy thrombocytopenia, mely kortikoszteroidra vagy más standard terápiára nem reagál
- B-tünetek jelenléte: 6 hónap alatt >10%-os súlyvesztés, fáradtság, hosszan tartó láz infekció nélkül, tartós éjszakai izzadás infekció nélkül [30].

Hypogammaglobulinémia vagy paraproteinemia önmagában nem jelent terápiás indikációt. Az abszolút lymphocyta szám önmagában szintén nem jelent terápiás indikációt, mivel a keringő CLL-es sejtek igen kis méretűek, ezért hiperviszkozitási szindróma nem jelentkezik. A kedvezőtlen citogenetikai eltérés (del17p) önmagában, tünetek nélkül szintén nem jelent terápiás indikációt [2].

A kezelést igénylő betegek monoterápiát vagy kombinált kemoterápiát/ kemo-immuno terápiát vagy más kombinált kezelést kapnak. Monoterápiában különböző hatásmechanizmusú szerek állnak rendelkezésre, mint pl. citosztatikumok (alkiláló szerek, purin analógok, Bendamustine), monoklonális antitestek (anti-CD20 terápia – Rituximab, Ofatumumab, Obinutuzumab vagy anti-CD52 antitest – Alemtuzumab), B-sejt receptor (BCR) szignálúton ható szerek (Idelalisib, Ibrutinib, Acalabrutinib), BCL-2 (B-cell lymphoma 2) gátlók (Venetoclax), immunmodulálok (Lenalidomide). A kombinált kemoterápia legtöbbször fludarabin + ciklofoszfamid [2]. A standard immun-kemoterápiás kezelésre a betegek sokszor az előrehaladott életkor és a kísérőbetegségek miatt nem alkalmasak. Ezenfelül a 17p deléciót hordozó betegek a standard terápiákra sokszor rezisztensek. Az elmúlt években a CLL kezelésére számos új terápiás szert vezettek be. Közülük kiemelendő a Bruton tirozinkináz (BTK) gátló Ibrutinib, a foszfatidilinozitol -3- kináz gátló Idelalisib és az anti-apoptotikus Venetoclax [2, 3]. A 2017. évi ajánlás szerinti terápiás algoritmust a 2. táblázatban foglaltuk össze [2].

2. Táblázat. Terápiás összefoglaló a 2017-es ajánlás alapján [2].

Elsővonalbeli kezelés

Stádium	Fitness	del(17)p TP53 mut	Terápia
BINET A-B, RAI 0-2, inaktív	Irreleváns	Irreleváns	Nincs
Aktív betegség vagy BINET C vagy RAI 3-4	Go go	Nem	FCR (>65 év BR?)
		Igen	Ibrutinib, Idelalisib+Rituximab (Allogén őssejt Tx)
	Slow go	Nem	Chlorambucil + Obinutuzumab vagy + Rituximab vagy + Ofatumumab vagy Ibrutinib
		Igen	Ibrutinib, Alemtuzumab, HD Rituximab vagy Ofatumumab

Másodvonalbeli kezelés

Válasz elsővonalbeli kezelésre	Fitness	Terápia
Refrakter vagy 3 éven belül progrediáló	Go go	Terápiaváltás a következők valamelyikére: Ibrutinib, Idelalisib + R, FA, FCR (BR után), Venetoclax, A-Dex, Lenalidomid (+R), BR (FCR után), konszolidációs kezelés vagy allogén Tx felmerül
	Slow go	Terápiaváltás a következők valamelyikére: Ibrutinib, Idelalisib + R, Venetoclax, A, FCR-lite, BR, Lenalidomid (+R), Ofatumumab, HD R
Progresszio >3 év után	Irreleváns	Elsővonalbeli terápia ismétlése

A, Alemtuzumab; B, Bendamustine; C, ciklofoszfamid; Dex, Dexamethason; F, Fludarabin; HD, nagy dózisú; mut, mutáció; O, ofatumumab; R, Rituximab; Tx, transzplantáció

1.1.10. A CLL eredete

A CLL eredetét még nem sikerült pontosan feltárni, ugyanakkor számos teória ismert a CLL keletkezésével kapcsolatban. CLL-ben a tumorsejtek CD19, CD5 és CD23 mellett IgM és IgD felszíni antigéneket expresszálnak. Az immunglobulin nehéz lánc génben az esetek 50-60%-ában mutáció van jelen (M), míg az esetek egy részében a génben mutáció nem mutatható ki (NM). Ennek alapján a CLL-t korábban 2 csoportra osztották: M-CLL és NM-CLL. Az M-CLL-ben a sejtek a teória szerint a centrum germinatívumba bejutott B-sejtekből származnak és ezen sejtekben az *IgHV* gén a normális szomatikus hipermutációs folyamaton átesett [31, 32]; míg az NM-CLL sejtei a naív B-sejtekből származnak [33].

Ugyanakkor az *IgHV* gén mutációja nem véletlenszerűen alakul ki a CLL sejtekben; illetve a CLL sejteiben jelen lévő mutáció különbözik a normál B-sejtekben jelen lévő mutációktól [32, 34, 35]. Microarray vizsgálatok alapján az NM- és M-CLL sejteinek génexpressziós profilja csak néhány génben tér el egymástól, ugyanakkor az NM- és M-CLL sejtei a normál B-sejtektől génexpresszió alapján olyan nagy mértékben térnek el, hogy feltételezés szerint egy sejttypusból származik mind az M-, mind az NM-CLL és egyéb, nem génszintű promotáló faktor magyarázza az M és NM esetek különbözőségét [36].

Más elképzelés szerint a CLL sejtek előalakjai a marginális zóna B-sejtjeiből is származhatnak. Ezt az elképzelést támasztja alá, hogy a marginális zóna B-sejtjei

funkcionális szempontból, ill. fenotípus tulajdonságai alapján is hasonlítanak a CLL sejtheihez [37]. A marginális zóna (MZ) B-sejtjei valóban hasonlítanak a CLL sejtheihez a tekintetben, hogy az MZ B-sejtek is IgM és IgD felszíni antigéneket expresszálnak, de ezen sejtek CD5-t és CD23-t a CLL sejtekkel ellentétben nem expresszálnak. Ez az eltérés magyarázhatja azt a feltételezést, miszerint a CD5 és CD23 expresszió a betegség aktiválódása során jelenik meg [38, 39].

M- és NM-CLL-es betegek vérmintáinak citometriai vizsgálata során nyert sejteik végzett mély szekvenálás során ismert onkogének, mint például az *SF3B1* és *NOTCH1* gének mutációját igazolták. Ezek a mutációk a CD34+ myeloid progenitor sejtekben és a CLL-es tumorsejtekben is kimutathatóak voltak, mely alapján feltételezhető, hogy a driver mutációk a CLL keletkezésének igen korai stádiumában kialakulnak [40]. Morabito és mtsai. eredményei alapján felmerül a CLL hemopoetikus őssejt (HSC) eredete is, ugyanis vizsgálataik szerint CLL-ben a tumorsejtek azon képessége, hogy klonális B-sejteket tudnak létrehozni valószínűleg az őssejtekben alakul ki [12]. Ez felveti a lehetőségét annak, hogy CLL-ben az első, leukemogén történés a multipotens hemopoetikus őssejtekben megy végbe [4]. A naiv B-sejtek – melyek egy része mutációkat hordoz – belépnek a nyirokcsomóba, ahol újabb mutációk a BCR szignálút aktivációjához vezetnek, mely feltehetően definitív klonális transzformációhoz vezet és a CD5+ B-sejtek elszaporodnak. A hemopoetikus őssejt eredet mellett érdemes megemlíteni ugyanakkor, hogy az M- és NM-CLL sejteiben a NOTCH1 szignálút aktivitása, a mRNS splicing folyamata, a DNS károsodásra adott sejtválasz, valamint a gyulladásos válaszreakció igen eltérőek [40].

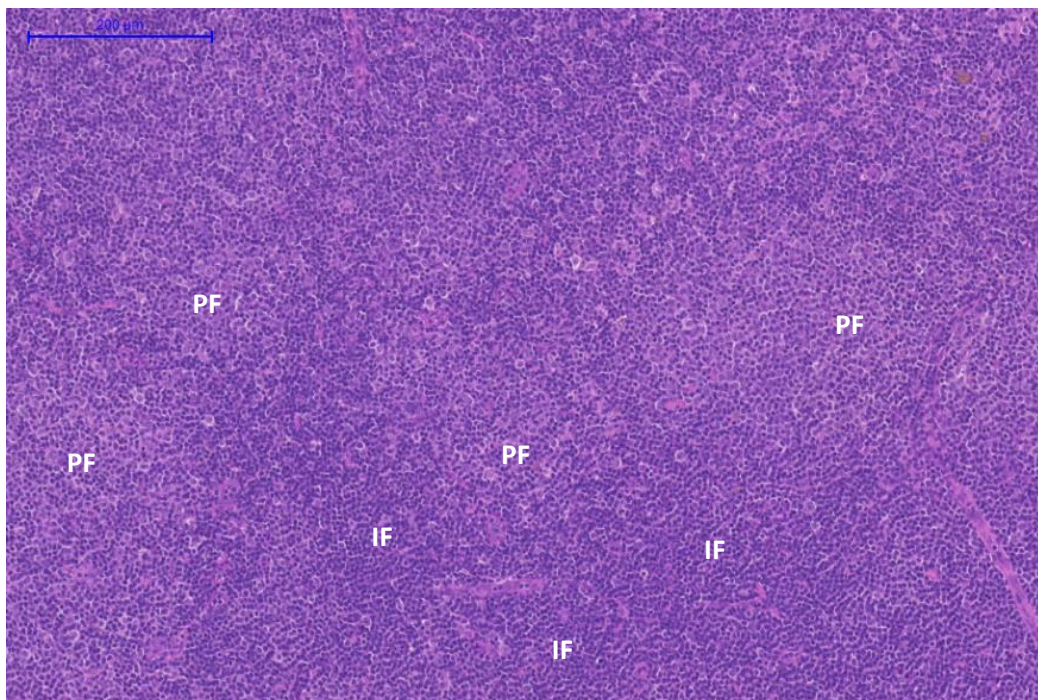
1.1.11. A pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL jellemzői, prognosztikai jelentősége

A nyirokcsomót érintő CLL/SLL szövettani morfológiája alapján diffúz és pszeudofolikuláris mintázatot (6. ábra) mutató formákat különböztetünk meg. A pszeudofolikulusok szövettani metszeten a valódi follikulusokkal ellentétben szabálytalan alakú, változó méretű, átnézeti képen világos területek, melyekben nagyobb nagyítással prolymphocyták és paraimmunoblastok azonosíthatóak. A PF sejteik CD10 és Bcl-6 negatívak, Bcl-2 pozitívak, a típusos CLL sejtek között nagyméretű Ki-67 pozitív sejtek vannak jelen [41-43].

Évtizedek óta számos tanulmány vizsgálta és vizsgálja a pszeudofollikulusok jelenlétének prognosztikai szerepét. Morrison 1989-es SLL esetekkel végzett tanulmányában nem talált összefüggést a pszeudofollikulusok jelenléte és a túlélés között [44]. Garcia és munkatársai is hasonló eredményre jutottak. Pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL-es nyirokcsomó mintákon végeztek ZAP-70 immunhisztokémiai vizsgálatot, valamint ezen esetekben FISH vizsgálatot nézték a kromoszóma eltérések jelenlétét, illetve vizsgálták az *IgHV* gén mutációs státuszát is. A ZAP-70 pozitivitás egyértelmű összefüggést mutatott a kedvezőtlen kromoszóma eltérések jelenlétével, valamint magasabb expressziója volt azokban az esetekben, amelyekben az *IgHV* génben mutáció nem volt kimutatható. A pszeudofollikuláris mintázat eseteikben nem mutatott összefüggést a már ismert prognosztikai markerekkel [45]. Más tanulmányok is alátámasztották, hogy a pszeudofollikulusok mérete és a paraimmunoblastok száma nem mutat összefüggést a klinikai lefolyással [46, 47], azonban később utánkövetéses vizsgálatokban ezzel ellentétes megfigyelések születtek, miszerint a betegség előrehaladtával a PF-ok száma és mérete növekszik [48]. Giné és munkatársainak vizsgálatai alapján azokban a CLL-es betegekben, akiknek a nyirokcsomóiban kiterjedt PF-ok voltak igazolhatóak, a betegség agresszívabb lefolyású, az össztúlélés pedig rövidebb volt [49]. Gibson és munkatársai a vizsgálataikban kimutatták, hogy a PF-ok sejtjeinek c-Myc fehérje expressziója a környező interfollikuláris terekben (IF) lévő kisméretű CLL-sejtek expressziójához viszonyítva magasabb [50]. A ciklin D2 fehérje overexpresszióját a PF-okban szintén kimutatták. Igawa és mtsai a fokozott ciklin D2 expresszió okának felderítése céljából további immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztek NFκB, p15, p16, p18 és p27 antitestekkel. Hat esetből ötben volt fokozott az NFκB expresszió, melyről ismert, hogy direkt indukálja a ciklin D2-t a *CCND2* gén promoter régiójához kötődve. A p27 expressziója alacsony, a p15-é fokozott volt. Eredményeik alapján feltételezhető, hogy nem csupán az NFκB serkenti a ciklin D2 termelést, hanem indirekt módon, a p27 downregulációja révén a c-myc is részt vesz e folyamatban [51]. Immunhisztokémiai vizsgálatok során a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL esetek egy részében ciklin D1 expressziót is megfigyelték a PF-okban, azonban a PF-os mintázatot nem mutató esetek között is előfordultak olyanok, amelyekben ciklinD1 expresszió kimutatható volt. *CCND1* transzlokációt egyik esetben sem igazoltak [52]. A felsoroltak mellett az apoptózist gátló survivin fehérje expressziója szintén magasabb a pszeudofollikulusok területén [49]. Irodalmi adatok azt a nézetet támasztják alá, hogy a

pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL esetek gyakrabban transzformálódnak agresszívabb formába [43]. A 2008-as WHO 2016-os revíziója is kiemeli, hogy a nagy, egybefüggő és/vagy kifejezetten proliferáló pszeudofolikularis mintázatot mutató CLL prognózisa rosszabb [1, 4].

Munkacsoportunk korábbi tanulmányaiban igazolta, hogy a pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL-es betegek nyirokcsomóiban a rosszabb prognózissal járó citogenetikai eltérések a pszeudofolikulusok sejtjeiben nagyobb gyakorisággal fordulnak elő [53].



6. ábra Pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL-es beteg nyirokcsomójának szövettani metszete (HE, 50x) A világos területek a pszeudofolikulusok (PF), míg a köztük látható sötétebb területek az interfollikuláris terek (IF).

A pszeudofolikuláris mintázat CLL-ben a csontvelő infiltrátumban is megjelenhet. A legújabb vizsgálatok alapján a csontvelői pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL rosszabb prognózisú a diffúz csontvelői infiltrációt mutató CLL esetekhez képest. A vizsgálat szerint a betegek fiatalabbak (a tanulmányban 53 év volt az átlagéletkor), gyakrabban vannak B-tüneteik és a *TP53* gén deléciója és/vagy mutációja is gyakoribb ezekben az esetekben (45,4%). Ugyanakkor a ZAP-70 és CD38 expresszió, illetve az *IgHV* gén mutációs státuszában szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Az első diagnózistól a kezelés szükségességéig eltelt idő rövidebbnek bizonyult, Richter transzformáció gyakrabban fordult elő és az ösztélélés is rövidebb volt [54].

I.2. A mikroRNS-ek

I.2.1. A mikroRNS-ek és funkciójuk

A mikroRNS-ek olyan rövid, nem kódoló, körülbelül 22-24 nukleotid hosszúságú RNS molekulák, melyek a poszttranszkripció szabályozás fontos szereplői. A mikroRNS-ek mind a növény-, mind az állatvilágban széleskörben megtalálhatók és a különböző azonosított mikroRNS-ek száma még mindig bővül. A humán genom több, mint 2000 miRNS-t tartalmaz [55]. Az első mikroRNS-t lin-4 néven 1993-ban *Caenorhabditis elegans*-ban írták le [56]. A kétezres évek elején már a mikroRNS-ek szerepét [57, 58] is ismerték. A génexpresszió szabályozásában betöltött döntően negatív szabályozó szerepe mellett felismerték, hogy egyes esetekben pozitív szabályozó szerepet töltenek be [59, 60]. Az egyes miRNS-ek akár száz különböző gén szabályozásában vehetnek részt, és a gének közel 30%-a legalább egy miRNS szabályozása alatt áll [61].

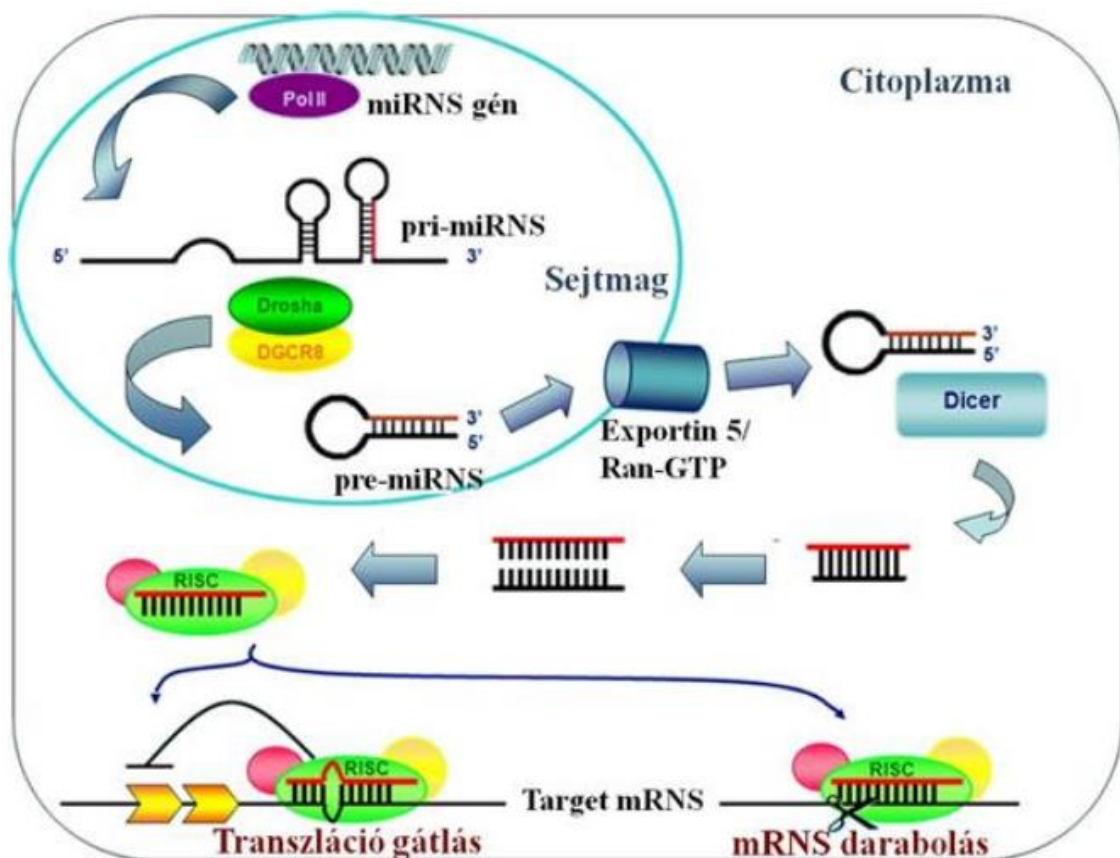
A mikroRNS-ek az evolúció során konzervatívan megőrzött módon fontos szerepet játszanak az egyedfejlődésben [62]. Szabályozó szerepük van a szívizomsejtek [63], a thymus [64], a központi idegrendszer [65], az orofacialis régió [66] szabályos kifejlődésében. Különböző biológiai folyamatokban vesznek részt, így például az immunfunkciókban, a proliferációban, a sejtciklus szabályozásában, különböző metabolikus folyamatokban, az öregedésben és az apoptózisban. Számos egyéb funkciójuk mellett, a miRNS-ek részt vesznek a hematopoiesis szabályozásában is [67-81]. A különböző sejtípusokban és szövetekben különböző miRNS-ek eltérő mértékben expresszálódnak [82].

I.2.2. A mikroRNS-ek bioszintézise és hatásmechanizmusa

A legtöbb miRNS transzkripcióját az RNS polimeráz-II végzi, ennek során egy hosszú primer transzkriptum, az ún. pri-miRNS keletkezik. A Drosha és DCCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) proteinek tartalmazó ún. nukleáris mikroprocesszor komplex hasítását követően létrejön a hajtű szerkezetű pre-miRNS. A pre-miRNS mintegy 70 nukleotid hosszúságú [83]. Ezután a pre-miRNS az exportin-5 fehérje segítségével kikerül a sejtmagból [84]. A citoplazmában a Dicer és a TRBP (the

human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein) komplex lehasítja a hajtű- kanyart és kialakul a kettős láncú, 22-24 nukleotidból álló érett miRNS [61, 85]. Ezután a komplementer lánc lebomlik, míg a vezetősál kapcsolódik a mikroRNS ribonukleoprotein komplexhez (angolul RNA induced silencing complex- RISC), ahol a miRNS és target mRNA egymással kapcsolódnak (6. ábra). A miRNS géncsendesítő szerepét vagy az mRNA degradációjával, destabilizálásával, vagy a transzláció gátlásával fejt ki [86, 87].

A mikroRNS-ek a target messenger-RNS (mRNS) komplementer 3' UTR (untranslated region) részéhez kötődve fejtik ki negatív szabályozó funkciójukat. Teljes komplementaritás esetén mRNA hasítás, közel teljes komplementaritás esetén transzláció gátlást eredményez kötődésük [88]. A mikroRNS-ek bioszintézisét és hatásmechanizmusát a 7. ábrán foglaltuk össze [89]. Eddigi ismereteink szerint humán gének legalább 10-30%-a mikroRNS szabályozás alatt áll [88].



7. ábra. A mikroRNS-ek bioszintézise és hatásmechanizmusa. Az RNS-polimeráz segítségével először pri-miRNS keletkezik, majd abból a Drosha létrehozza a pre-miRNS-t, mely az Exportin segítségével kijut a citoplazmába, ahol a Dicer kialakítja az érett egyszálú miRNS-t, mely a RISC-kel kapcsolatosan kötődik a cél-mRNS 3'UTR régiójához, melynek következménye a degradáció vagy transzláció-gátlás [89].

1.2.3. A miRNS-ek szerepe a daganatok kialakulásában

Számos tanulmány igazolta, hogy a mikroRNS-ek expressziójának változásai fontos szerepet játszanak a daganatok kialakulásában. A mikroRNS gének sokszor onkogének és tumorszuppresszor gének közelében lokalizálódnak. Régóta ismert, hogy számos mikroRNS eltérően expresszálódik normál, illetve daganatos szövetben. A mikroRNS-eket oncomiR és tumorszuppresszor-miR családokba is sorolhatjuk. Az oncomiR-ek onkogén szerepet töltenek be és overexpressziójuk révén a daganatok kialakulását és terjedését segítik. A tumorszuppresszor-miR-ek sokszor mutáció, promoter metiláció vagy kromoszóma transzlokáció révén gátlás alatt állnak a daganatokban, így kiesik a tumor növekedést gátló hatásuk [90-93]. Egyes mikroRNS-ek mind onko-, mind tumorszuppresszor-miR szerepet betölthetnek [94].

Újabb vizsgálatok eredményei alapján a mikroRNS-ek egy részét a gyulladásos folyamatokban felismert szerepük révén úgynevezett inflamma-miR-eknek is nevezhetjük. A veleszületett immunitás sejtjei a daganatsejtek mikrokörnyezetében nagy számban vannak jelen. A sejtproliferációt serkentő és gátló szignáljaik révén a daganatok kialakulásában és progressziójában, illetve a daganatsejtek proliferációjának kontrollálásában is szerepet játszanak. A döntés, hogy proliferáció vagy gátlás irányába haladjanak a folyamatok, részben gén expresszió változások által szabályozott, részben poszt-transzkripció szabályozás alatt áll. A tumorok mikrokörnyezetében megtalálható specifikus tumor-asszociált immunsejtek jelenléte, illetve aktivációja mikroRNS-ek által is szabályozott folyamat. Daganatos betegségekben a mikroRNS-ek eltérő expressziójának egyrészt genetikai, másrészt epigenetikai okai vannak. A mikroRNS gének deletálódhatnak, amplifikálódhatnak, promoter metiláció vagy acetiláció mellett aberráns transzkripció vagy defektus a mikroRNS biogenezése során egyaránt előfordulhat. Egyes gének esetében a mikroRNS target 3'UTR régió szekvenciájának megváltozása is ismert. [95]. A HMG2A lokusz 3'UTR régiójának átrendeződése kapcsán például a let-7 mikroRNS szabályozó funkciója kiesik, ami folyamatos sejtproliferációhoz vezet [96, 97]. Nem kissejtes tüdőrákban a *KRAS* onkogén 3'UTR régiójának egy pontos nukleotid polimorfizmusa is ismert, mely a let-7a mikroRNS szabályozó funkciójának kiesése révén folyamatos *KRAS* expresszióhoz vezet [98].

A makrofágok antigén prezentáló szerepük mellett fagocita funkcióval is rendelkeznek, illetve gyulladásos folyamatot tudnak indukálni. A makrofágok heterogén csoportot alkotnak, általánosságban M1 típusú, klasszikus úton aktivált és M2 típusú,

alternatív úton aktivált makrofágokat különböztetünk meg. A két csoport sajátos gén expressziós profillal és funkcionális fenotípussal rendelkezik. A miR-155, -181, -451 fokozottan expresszálódik az M1 makrofágokban, az M2 makrofágokra a miR-125a-5p, -146a, -145-5p és -143-3p fokozott expressziója jellemző [95]. A miR-155 volt az első mikroRNS, melyről kiderült, hogy mind a természetes, mind a veleszületett immunitásban szerepe van [99]. A miR-155 az IL-13 receptor $\alpha 1$ expresszió szabályozásán keresztül gátolja a STAT6 aktivációt [100]. A felsoroltak mellett egyre több mikroRNS-ről bizonyosodik be, hogy szerepet játszanak gyulladásos folyamatokban, a daganatok progressziójában vagy éppen a daganatos proliferáció gátlásában. A daganatok progressziójában fontos lépés, hogy a daganatos szövetet ún. pro-tumor makrofágok infiltrálják. A miR-155 ebben a folyamatban is szabályozó szerepet tölt be [101].

1.2.4. A miRNS-ek szerepe a daganatok elleni terápiában

A mikroRNS-ek hatásmechanizmusa már alkalmazott és potenciális mikroRNS elleni terápia alapját képezi. Daganatos betegségekben az oncomiR-ek expressziójának gátlása, illetve a tumor szuppresszor miR-ek expressziójának serkentése eredményes lehet.

A mikroRNS-ek célgénhez való kötődésének gátlására számos szer létezik, ilyen pl. a mikroRNS szivacs (miRNA sponge), az antiszenz antagomerek és a kis molekula gátlók. A szintetikus mikroRNS szivacsok általában mikroRNS kötőhellyel rendelkező plazmid vagy vírus vektorok, melyek a sejtekben amplifikálódva fejtik ki hatásukat [102]. Az anti-miRNA oligonukleotidok (AMO) teljes komplementaritást mutatnak a target mikroRNS-sel és a kapcsolódás révén egyrészt a miR cél mRNS-hez való kötődését gátolják, másrészt serkentik a miR lebontását [103]. A specifikus miR-t gátló kis molekula inhibitorok (SMIR, small molecular inhibitor of specific miRNA) a target mikroRNS-t három különböző szinten tudják gátolni. Lehetőséget nyújt a pri-miRNS transzkripció gátlására, a pre-miRNS DICER segítségével történő érett mikroRNS-é alakulását tudja gátolni, illetve gátolhatja a RISC kötődését a target mRNS-hez [104]. Preklinikai, fázis I és fázis II vizsgálatokban mikroRNS-ek gátlásán alapuló terápiás szerek közül elérhetőek már miR-122, -155, -10b és -221 elleni szerek, illetve miR-t utánzó szerek miR-34 és miR-29b esetében [95].

A mikroRNS-ek gátlása mellett a daganatokban csökkent expressziót mutató tumor szuppresszor miR-ek serkentése vagy helyettesítése szintén fontos terápiás lehetőség. A mikroRNS-t „utánzó” szerek (miRNA mimics) közül a miR-34 mimic ígéretes szer szolid tumorokban és lymphomákban egyaránt [105].

1.2.5. A mikroRNS-ek szerepe a CLL kialakulásában és progressziójában

Ismert, hogy a szolid tumorok mellett malignus hematológiai betegségekben, így a különböző lymphomákban is kórosan expresszálódnak bizonyos miRNS-ek [88]. Calin és munkatársai 2002-ben írták le először a mikroRNS-ek jelentőségét lymphomákban. Azóta számos tanulmány készült, melyek feltételezik a mikroRNS-ek diagnosztikus, prognosztikus és prediktív marker szerepét számos lymphoid daganatos betegségben. A CLL kialakulásával és progressziójával kapcsolatban több, mint húsz különböző mikroRNS szerepét leírták. Tanulmányok alapján a CLL kialakulásában szerepet játszhat a miR15a/16, miR-222 és miR-181, míg a progresszióban a miR-223, -150, -29b/c, -150, -155-15a/16 szerepét feltételezik [90, 106-110]. Calin vizsgálataiban azt tapasztalta, hogy a miR-15 és miR-16 mikroRNS-ek expressziója CLL-ben jelentősen csökkent és ennek hátterében az esetek mintegy 65%-ában a 13q deléción miatti kialakuló heterozigótaság elvesztése áll (LOH, loss of heterozygosity) [90]. CLL-es sejtvonalon végzett vizsgálatokon a miR-221/222 expressziós szintje jelentősen magas volt, ami összefüggésben állt a p27 anti-apoptotikus fehérje alacsony expressziójával [106]. Marton és munkatársai CLL-es betegeken végzett vizsgálataikban a miR-155 megemelkedett expressziója mellett a miR-181a, let-7a és miR-30d jelentősen csökkent expresszióját figyelték meg [109]. A miR-155 magasabb expressziója különböző magas malignitású hematológiai betegségekben már ismert [111]. Feltételezhető, hogy a miR-155 proto-onkogén szerepet tölt be és a target gének (pl. *SOCS1* és *SHIP-1*) expressziójának szabályozásával elsősorban a fokozott sejtprolifерáció és sejttúlélés irányába hat [112, 113]. A miR-155 a B-sejt receptoron keresztül (BCR) is serkenti a sejtprolifерációt nem csak a B-sejtek aktiválása során, hanem a B-sejtes lymphomák egy részében is [114] [115]. CLL-es nyirokcsomó mintákon végzett tanulmányban in situ hibridizációval kimutatták, hogy a BIC/pri-miR-155 (a miR-155 előalakja) a PF-ok sejteiben fokozottan expresszálódik, ezért feltételezik, hogy a miR-155 szerepet játszhat a CLL progressziójában [110]. RNS in

situ hibridizációs módszerrel Wang és mtsai. 8 pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL-es beteg nyirokcsomójából származó mintáján igazolták, hogy a magasabb miR-155 és alacsonyabb miR-150 expressziót mutató tumorsejtek a PF-okban lokalizálódnak [110]. A miR-150 tumorszuppresszor funkciója ismert és csökkent expresszióját kimutatták már a legtöbb humán leukémiában, többek között a krónikus és az akut myeloid leukémiában is [116]. Feltételezések szerint az alacsonyabb miR-150 expresszió a BCR szignálút csökkent gátlásához vezet, melynek fokozott sejtproliferáció a következménye. A miR-150 egy másik célfehérjéje a FOXP1, melynek – részben a miR-150 csökkent expresszióján keresztül megvalósuló – fokozott expresszióját leírták CLL-ben és a fokozott expressziót rosszabb prognózissal hozzák összefüggésbe [117]. Calin egy másik vizsgálatában azt találta, hogy a rosszabb prognózisú, NM és magas ZAP-70 expresszióval rendelkező CLL-es betegekben a miR-15a, -195, -221, -23b, -155, -24-1, -146, -16-1 és -16-2 expressziója magas, míg a miR-223, -29a-2, -29b-2 és -29c expressziója alacsony [91]. A miR-29c alacsonyabb expressziója egyes vizsgálatokban rosszabb prognózissal társul [118]. Papakonstantinou szignifikánsan alacsonyabb miR-150, -29b, -29c és -101 expressziót talált a mutáltalan *IgHV* génnel rendelkező CLL-es esetekben a mutált *IgHV* génnel rendelkező esetekhez képest [119]. A miR-17-92a cluster család tagjainak magasabb expressziója gyakran megfigyelhető lymphomákban [120]. Kísérlet igazolja, hogy B-sejt specifikus miR-17-92a transzgen egerekben c-Myc mediált lymphoma fejlődik ki [121]; Gibson és mtsai. pedig leírták, hogy a CLL/SLL PF-aiban a c-Myc fehérje expressziója magasabb [50]. A miR-92a megváltozott expressziója CLL-ben szintén ismert [115, 118]. A miR-26a megváltozott expressziója szintén ismert CLL-ben. CLL-ben egyik célfehérjéje a PTEN [122]. Myc-mediált lymphomában a miR-26a EZH2-t szabályozó szerepe is ismert [123]. Kopparapu és mtsai. CLL-es betegek vérmintáin végzett vizsgálataiban szintén összefüggést találtak a miR-26a alacsonyabb expressziója és az EZH2 megnövekedett expressziója között [124].

Az irodalmi adatok alapján a CLL kialakulásával és progressziójával összefüggésbe hozható mikroRNS-eket a 3. táblázatban foglaltuk össze [112, 122-131].

3. Táblázat. A CLL és egyéb lymphomák kialakulásával és progressziójával összefüggésbe hozható főbb mikroRNS-ek és célfehérjék

mikroRNS	Lokalizáció	Lymphoma/leukaemia altípus	Bizonyított és feltételezett célfehérjék
hsa-miR-155	21q21.3	CLL, DLBCL, MCL, SMZL, NK/T, PMBCL, cHL, ALCL-ALK(-), MALT, PCMZL, BL	GCSAM, RTKN2, SMAD5, PIK3R1, INPP5D, DKC1, AKT2, AID, SHIP1, TP53INP1, SOCS1, AID, PU.1
hsa-miR-150	19q13.33	CLL, MCL, NK/T, cHL, PCMZL	TRAF6, DKC1, AKT2, GAB1, FOXP1
hsa-miR-181a	1q32.1	CLL, DLBCL, ATL	C-MYC, BCL-2, TP53INP1
hsa-miR-21	17q23.1	CLL, SMZL, NK/T, cHL, DLBCL	PDCD4, PTEN, ANP32A, SMARCA4
hsa-miR-15a	13q14.2	CLL, ALCL, MCL, CTCL	BCL-2, MCL1, CDK-6, TP53, HIF1A, BLIMP1
hsa-miR-16	13q14.2	CLL, ALCL, FL, cHL, CTCL, MCL	BCL-2, MCL1, CDK-6, TP53, HIF1A, BMI1
hsa-miR-29c	1q32.2	CLL, NMZL, FL	TCL1, MCL1, CDK-2, MCL-6, CDK-6, IGF-1R, STAT3
hsa-miR-34a	1p36.22	CLL, DLBCL	BCL-2, CyclinD1, CyclinE2, CDK4, c-MYC, Sirt 1, FOXP1, MET
hsa-miR-221	Xp11.3	CLL, BL, NMZL, DLBCL(ABC)	p27, LMO2, KIT, PTEN
hsa-miR-222	Xp11.3	CLL, BL, DLBCL, DLBCL(ABC)	p27, LMO2, KIT, PTEN
hsa-miR-223	Xq12	CLL, NMZL, CTCL, MALT	LMO2
hsa-miR-101-1	1p31.3	CLL, FL, ALCL	EZH2, FOXP1
hsa-miR-93-5p	7q22.1	CLL	TP53, INP1
hsa-miR-650	22q11.22	CLL	CDK1, ING4, EBF3
hsa-miR-92a-1	13q31.3	CLL, AML, ALL	MCL1, DOCK5, FBXW7, BCL2L11, LMO2, NOTCH1, PTEN
hsa-miR-142-3p	17q22	CLL, NK/T, EBV+ ATL	IL1A
hsa-miR-142-5p	17q22	CLL, BL, MALT	IL1A, TP53INP1
hsa-miR-15b	3q25.33	CLL, APL	E2F1
hsa-miR-331	12q22	CLL, ALL, AML	E2F-1, SOCS1
hsa-miR-26a	3p22.2	CLL	EZH2, PTEN

ABC, aktivált B-sejtes; ALCL, anaplasias nagysejtes lymphoma; ALL, akut lymphoid leukaemia; AML, akut myeloid leukemia; APL, akut prolymphocytás leukemia; ATL, felnőttkori T-sejtes leukemia; BL, Burkitt lymphoma; cHL, klasszikus Hodgkin lymphoma; CLL, krónikus lymphocytás leukemia; CTCL, kután T-sejtes lymphoma; DLBCL, diffúz nagy B-sejtes lymphoma; FL, follikuláris lymphoma; MALT, MALT lymphoma; MCL, köpenysejtes lymphoma; NK/T, NK/T sejtes lymphoma; NMZL/PCMZL, nodális/primer kután marginális zóna B-sejtes lymphoma; PMBCL, primer mediastinalis B-sejtes lymphoma; SMZL, splenikus marginális zóna lymphoma

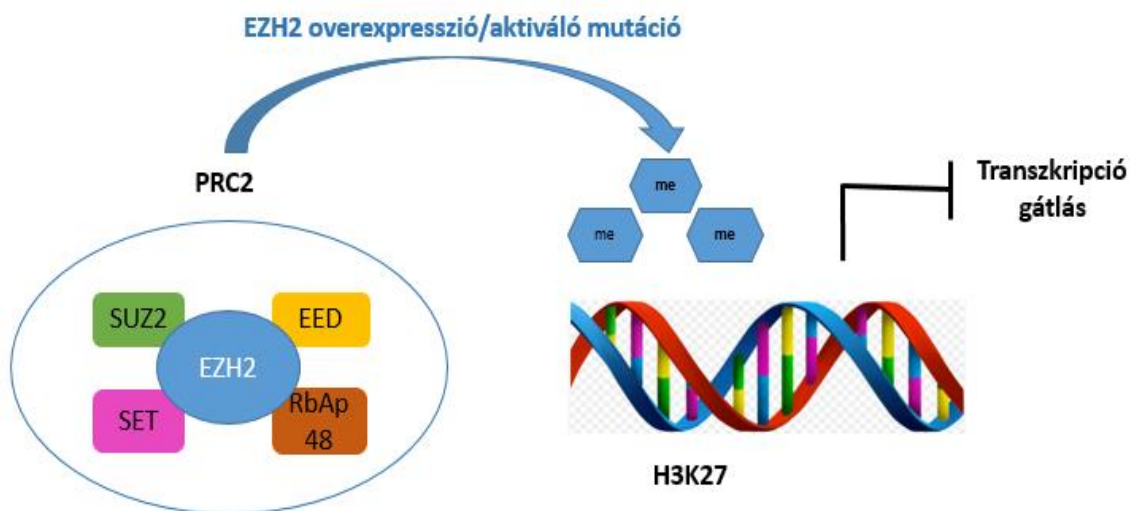
I.3. Enhancer of zeste 2

Az Enhancer of zeste 2 (*EZH2*) gén a 7-es kromoszóma hosszú karjának 35-ös régiójában (7q35) helyezkedik el. 20 exont tartalmaz, amelyek összesen 746 aminosavat kódolnak [132]. Az *EZH2* fehérje jelenlegi ismereteink szerint öt fő funkcionális alegységből áll: az EID (early mouse embryogenesis) domain az EED (embryonic ectoderm development) protein megkötésében játszik központi szerepet; a következő két alegység a PRC2 (polycomb repressive complex 2) alkotójával, a SUZ12-vel (suppressor of zeste 12 homolog) való kapcsolódást biztosítja; a ciszteinben gazdag CXC-régió és a SET-domain (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax) pedig együttesen felelősek a metiltranszferáz aktivitásért [133].

I.3.1. Az *EZH2* szerepe a biológiai folyamatokban

Az *EZH2* az EED és SUZ12 mellett a PRC2 harmadik eleme. A komplex feladata a histone H3 lysine 27 (H3K27) metilációja [134-137]. A SET domain a PRC2 katalitikus alegységeként hiszton metiltranszferázt (HMTáz) tartalmaz és metilációt katalizálva járul hozzá bizonyos gének csendesítéséhez (8. ábra). E funkciója által fontos a sejtciklus, a sejt differenciálódás és így a tumorképződés szabályozásában is [138]. Számos gén transzkripciójának epigenetikus szabályozója. Fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben, azonban ismert, hogy funkcionális aktivitását megőrzi a felnőtt őssejtekben, így a hemopoetikus őssejtekben is. Szerepe van a myogén differenciációban, az X-kromoszóma inaktivációban és a migráló primordiális őssejt újraprogramozásában [139-141], valamint a carcinogenezisben is [142]. A központi idegrendszer sejtjeiben az *EZH2* gátolja az astroglia differenciációt, és így gliomák kialakulását indukálhatja [143]. Az *EZH2* aberráns működése ismert szolid tumorokban, ill. malignus hematológiai betegségekben is [144]. Áttétes prosztatarákban igazolták, hogy egy *EZH2* célgén β_2 -adrenerg receptort kódol. Gátlása indukálja az epitheliális sejtek malignus transzformációját [145]. Az *EZH2* a prosztatarákok metasztázis képzésében is szerepet játszik a Ras és az NF-kB aktiválásán keresztül [146]. Az *EZH2* szerepe a tumoros angiogenezisben szintén ismert, a VEGF szignálutat aktiválja a negatív szabályozó *VASH1* represszióján keresztül [147]. Az *EZH2* overexpressziója ismert a high-grade centrum-germinativum (CG) eredetű lymphomákban, úgymint diffúz nagy B-sejtes lymphomában és high-grade follikuláris

lymphomában (FL) [148]. Utóbbiakban az EZH2 aktiváló mutációi is ismertek [149]. Ezen aktiváló mutációk révén vélhetőleg a H3K27 megváltozott metilációs rátáján át vezet a PRC2 célgénjeinek kóros gátlásához [150-152]. Az EZH2 expresszióját számos molekula szabályozza, közülük tartozik a miR-26a, c-Myc, E2F1 és Rb (Retinoblastoma) [123, 124, 153-156].



8. ábra Az EZH2 hatásmechanizmusa. Az EZH2 a PRC2 komplex tagjaként a H3 hisztonfehérje K27-es lizinét trimetilálva vezet a transzkripció gátlásához.

1.3.2. Az EZH2 szerepe a normál hematopoézisben

Az EZH2, EED vagy SUZ12 gén funkcióvesztő mutációnak a következménye a hemopoetikus őssejtek és progenitor sejtek aktivitás fokozódása. Ez alapján feltételezhető, hogy a PRC2 komplex a hemopoetikus őssejtek negatív szabályozója [157]. Az EZH2 fokozott expressziója védelmet nyújt a hemopoetikus őssejtek kimerülése ellen sorozatos transzplantációk során [158]. Az EZH2 a felnőtt hemopoetikus őssejteket meg tudja védeni az előregedéstől a differenciáció szabályozása révén [159]. Az EZH2 az apoptózis gátlása és a proliferáció serkentése révén növeli a nyugvó hemopoetikus őssejtek számát. A PRC2 komplex számos targetje közül az egyik legfontosabb a CDKN2A, mely az Rb/p53 útvonalon keresztül a proliferáció negatív szabályozója. Az EZH2 a pro-apoptotikus NOXA, p21 és WIG1 géneket gátolva is védi a hemopoetikus őssejteket a sejthaláltól [160]. A

lymphopoesisben a proilferáló centrum germinatívum B-sejtekben, a cirkuláló T- és B-sejtekben és a plasmablastokban az EZH2 expressziója fokozott [161]. Ezzel egybehangzóan a trimetilált H3K27 szintje is alacsony [162]. Az EZH2 DNS repair gátló hatásának köszönhető az is, hogy az aktivált B-sejtek az *Ig* gén aktiváció-indukált citidin deamináz (AID) mediált szomatikus hipermutációja után túlélnek [149]. A B-sejtek differenciálódása és érése során az EZH2 szintje lecsökken [163].

1.3.3. Az EZH2 szerepe a lymphomagenézisben

Számos tanulmány igazolta, hogy az EZH2 fokozott expressziója szerepet játszik a malignus hematológiai betegségek kialakulásában. Lymphomákban a fokozott EZH2 expresszió összefüggésbe hozható a fokozott sejtproliferációval és a rosszabb prognózissal [164, 165]. A Burkitt lymphomák 100%-ában, grade 3-as follikuláris lymphomák 87,5%-ában és diffúz nagy B-sejtes lymphomák 87,5%-ában mutatható ki fokozott EZH2 expresszió [164]. A fokozott EZH2 expresszió hátterében leggyakrabban az EZH2-t szabályozó miR-101 és miR-26a Myc-mediált gátlása áll [156]. B-sejtes akut lymphoblasztos leukémiában az EZH2 fokozott expressziója jól korrelál a tumor szuppresszor gén p21, p53 és PTEN csökkent szintjével [166]. Monoklonális gammopathiában és myeloma multiplexben szintén ismert, hogy az EZH2 fokozottan expresszálódik [167]. A hematológiai betegségekben –a szolid tumorokkal ellentétben– az EZH2 fokozott expressziójának hátterében nem génamplifikáció áll, hanem pozitív szabályozóinak fokozott működése. DLBCL-ben és follikuláris lymphomában emellett ismert a gén katalitikus domainjében az EZH2-t aktiváló mutáció jelenléte [168].

1.3.4. Az EZH2 szerepe a CLL-ben

Az EZH2 szerepe a CLL patomechanizmusában nem tisztázott. Kemenade és mtsai. kimutatták, hogy CLL-ben a Ki-67 pozitív nagyméretű tumorsejtek expresszálják az EZH2-t [148].

Az EZH2 overexpressziója CLL-ben ismert és összefüggésbe hozható a rosszabb prognózissal. Azokban a CLL-es betegekben, akiknek lymphocita számuk a perifériás vérben emelkedett, illetve magas ZAP-70 expressziót mutatnak vagy kromoszóma eltérés igazolható, magasabb az EZH2 expressziója [169]. Más tanulmányokban az

EZH2 magasabb expresszióját figyelték meg azokban az esetekben ahol az *IgHV* gén nem voltmutált [170, 171].

Az EZH2 expresszióját egyes mikroRNS-ek is befolyásolják. A NM, rosszabb prognózisú CLL-es betegekben az EZH2 overexpresszióját a miR-101 csökkent expressziójával hozzák összefüggésbe [119]. Szolid tumorokon végzett vizsgálatokkal igazolták, hogy az EZH2 egyik negatív szabályozója a miR-26a [172]. Kopparapu és munkatársai vizsgálataikban azt találták, hogy a rosszabb prognózisú EZH2 overexpressziót mutató CLL-es betegek miR-26a expressziója csökkent, és feltételezik, hogy az EZH2 expresszió egyik negatív szabályozója CLL-ben is a miR-26a [124].

Más tanulmányok szerint az EZH2 expresszióját mikroRNS-ek mellett számos más molekula is szabályozza, pl. a c-Myc, E2F1, és Rb [50, 173-176]. A c-Myc az EZH2 expresszióját fokozza az őt negatívan szabályozó miR-26a gátlásával [173]. A c-Myc fokozott expresszióját szintén kimutatták korábban a CLL/SLL PF-aiban [50]. A c-Myc ugyanakkor az E2F1 transzkripció faktort is aktiválja [174], mely ugyancsak serkenti az EZH2 expressziót [153]. Az E2F1 szabályozásában a tumorsuppresszor Rb fehérje is részt vesz; a foszforiláció révén inaktiválódó Rb (pRb) elengedi és ezáltal aktiválja az E2F1-et [176, 177]. Ismert az is, hogy az SNF5 (SMARCB1-et is tartalmazó protein komplex) az EZH2 expresszióját gátolja, ezért ennek hiánya esetén egyes lymphomák progressziója gyorsul [178].

Non-Hodgkin lymphomákban az *EZH2* mutáció megjelenése viszonylag gyakori: DLBCL-ban 9,7-22%-ban, FL-ban pedig 7-22%-ban számíthatunk jelenlétére. A vizsgált esetekben a mutáció a 641-es aminosavat érintette: fiziológiásan ezen a helyen tirozin épül be a fehérjébe, FL és DLBCL egyes eseteiben azonban leggyakrabban fenilalanin, ritkábban szerin, aszparagin és hisztidin [168]. FL-ban 3 különböző hot spot mutáció ismert (Y646, A682, and A692) [179, 180]. *EZH2* aktiváló mutációk CLL-ben jelenlegi tudásunk szerint nem ismertek [181].

1.3.5. Az EZH2 terápiás jelentősége

Az EZH2 gén és fehérje szabályozó szerepének megismerése fontos szerepet játszott az ellene kifejlesztett gyógyszerek megalkotásában. Az EZH2 expresszió befolyásolására számos lehetőség van. Transzkripció szinten lehet gátolni az EZH2-t Src inhibitorokkal. Ezáltal az EZH2 mRNS és fehérje szintje is csökken [182]. A

dihidrofolát reduktáz gátló methotrexát szintén csökkenti az EZH2 expresszióját, ezen keresztül pedig tumor szuppresszor géneket serkent, valamint az E-cadherint, melyet az EZH2 negatívan szabályoz [183]. Transzlációs szinten az EZH2 fehérje szintjének csökkentése lehetséges kis interferáló RNS (siRNS) duplex vagy rövid hajtú RNS (shRNS) segítségével [184, 185]. Az EZH2-t szabályozó miRNS-ek serkentése is jelentős terápiás szempontból. Az EZH2 fehérje depléciót előidéző szerek a legnépszerűbbek az anti-EZH2 terápiában. A legismertebb a 3-deazaneplanocin A (DZNep). Ez a szer nem EZH2-specifikus, a PRC2 komplex másik két tagjának, az EED-nek és SUZ12-nek a szintjét is csökkenti [186]. A szelektív EZH2 inhibitor ennél specifikusabb, így a nem-tumoros folyamatokban kevésbé érvényesül a szer gátló hatása. Az EZH2 hiszton-metiltranszferáz aktivitásának szelektív gátlása a PRC2 komplex lebontása nélkül ígéretes szer lymphomákban, vad típusú és mutáns EZH2 esetén is hatásos [187]. Az EZH2 mutáció malignus hematológiai betegségekben gyakori, ezekben a daganatokban a mutáns EZH2 szelektív gátlói lehetnek hatékonyak [188]. A hiszton-metiltranszferázok mindegyike a metil-donor SAM-et (S-adenosylmethionine) használja kofaktorként, de a metil-donorok szerkezetükben eltérnek, ami lehetőséget ad specifikus EZH2 HMTáz aktivitást gátló szer kifejlesztésére [187].

Az EZH2, illetve a PRC2 komplex hatásmechanizmusa kapcsán még nem teljesen egyértelmű, hogy a célgén mely specifikus régióján dokkolódik az EZH2 vagy a komplex.

A HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA) hosszú nem-kódoló RNS (lncRNA, long non-coding RNA) fontos szerepet játszik a génszabályozásban. Feladata specifikus kromatin régiók megjelölése, ami lehetővé teszi a PRC2 komplex számára a dokkolást.

A HOTAIR-EZH2 interakció jelentősége nagy, ugyanis a HOTAIR fokozott expresszióját számos szolid tumorban kimutatták és ez célzott terápia alapját képezheti [189]. Az EZH2-t a CDK1 és -2 (ciklin-dependens kináz 1 és 2) foszforilálja és a foszforiláció következtében fokozódik a HOTAIR-EZH2 kötődés [190]. A folyamatnak megfelelő domainen történő foszforiláció gátlás szintén terápiás jelentőségű lehet [191]. Az EZH2 fehérje többszörösen foszforilált. Foszforiláció révén a fehérje aktivitása befolyásolható, többek között a metiltranszferáz aktivitását lehet csökkenteni [192].

Összességében elmondható, hogy a pszeudofollikulusok különleges struktúrák a CLL/SLL-es nyirokcsomókban, melyeknek központi szerepe valószínűsíthető a

betegség fenntartásában és progressziójában, ugyanakkor a biológiai sajátosságai még kevésbé ismertek. Vizsgálataink alapvető célja az volt, hogy tovább karakterizáljuk a CLL/SLL pszeudofollikulusait és ezzel hozzájáruljunk a betegség pontosabb megismeréséhez. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a CLL prognózisát negatívan befolyásoló tényezők közül egyes mikroRNS-ek és az EZH2 expressziója eltér-e a PF-okban a környező, interfollikuláris terekhez képest.

II. CÉLKITŰZÉSEK

- ❖ A CLL kialakulásával és/vagy progressziójával összefüggő 19 mikroRNS expressziójának összehasonlítása pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es nyirokcsomók PF és IF területein.
- ❖ Az EZH2 fehérje expressziójának vizsgálata a PF-okban és az IF terekben.
- ❖ Az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expressziójának vizsgálata a PF-okban és az IF terekben.
- ❖ Az *EZH2* gén aktiváló mutációinak analízise CLL/SLL-es esetekben.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1 Beteganyagok

Tanulmányunkban 15 CLL/SLL-es beteg formalinban fixált paraffinba ágyazott (FFPE) nyirokcsomó biopsziás mintáját használtuk. Valamennyi minta diagnózisát az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben állították fel a World Health Organization lymphoid szövetek daganatos megbetegedéseinek klasszifikációjára vonatkozó kritériumainak megfelelően, hisztopatológiai és immunfenotípus vizsgálatok alapján [193, 194].

A szövetminták az elsődleges diagnózisból, a kezelések előtti időszakból származtak. Mikroszkópos vizsgálattal minden CLL/SLL-es nyirokcsomó minta pszeudofollikuláris mintázatot mutatott. A betegek nemi aránya kiegyenlített volt, vizsgálatainkba 7 nő és 8 férfi szövetmintáját vontuk be. A diagnóziskor a medián életkor 58,47 év (40-78 év) volt. Vizsgálataink ideje alatt egyik betegnél sem mutattak ki high-grade transzformációt. A legutóbbi utánkövetés során a 15 beteg közül kettőben Richter transzformáció (3. és 4. esetek), míg 1 esetben prolymphocytás transzformáció (6. eset) fejlődött ki. A betegséggel összefüggő halálozást nem dokumentáltak. A betegek prognosztikai szempontból jelentős kromoszóma eltéréseinek (del13q, del17p, del11q és tri12) FISH vizsgálati eredményei mind a 15 esetben rendelkezésre álltak, mivel ezeket a CLL diagnózisa során az intézetben rutinszerűen elvégzik. A betegek fontosabb klinikai adatait (nem, életkor a diagnóziskor, FISH vizsgálatok eredményei) a 4. táblázat foglalja össze.

A vizsgálataink elvégzéséhez etikai engedéllyel rendelkezünk (TUKÉB-1552012).

III.2 MikroRNS expresszió vizsgálat kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval

Munkánk során 19, az irodalmi adatok alapján a CLL kialakulásával és/vagy progressziójával összefüggésben álló mikroRNS (miR155, -150, -29c, -26a, -181a, -21, -15a, -16, -34a, -221, -222, -223, -101, -93-5p, -650, -92, -142-3p, -142-5p, -15b) expresszióját vizsgáltuk TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies) segítségével, kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakcióval (kvantitatív real-time PCR, qRT-PCR).

A mikroRNS-ek expresszióját 15 pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es nyirokcsomó lézermikrodisszekcióval szeparált PF és IF tereiben külön-külön meghatároztuk. A mikroRNS expressziós vizsgálatok folyamatát a 9. ábra foglalja össze. A vizsgálat egyes lépéseit a következő alfejezetekben részletesen ismertetem.

4. Táblázat. A betegek klinikai adatai és a kromoszóma vizsgálatok eredményei

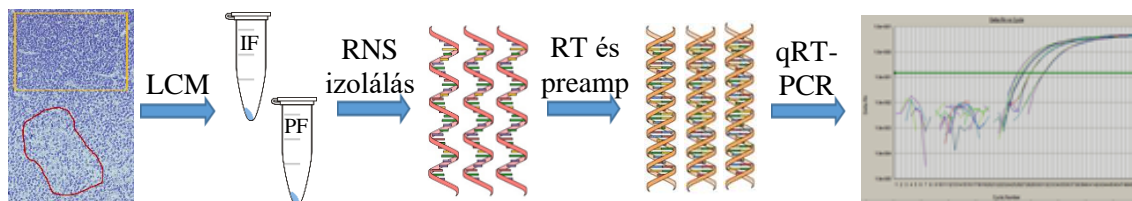
Esetszám	Klinikai adatok		FISH vizsgálatok eredményei
	Nem	Életkor diagnóziskor	
1	F	52	nincs eltérés
2	F	40	nincs eltérés
3	F	59	del11q
4	N	70	del6q
5	F	50	del11q, del13q
6	F	49	del11q, del13q
7	N	69	del15p
8	N	58	del11q, del13q
9	F	49	nincs eltérés
10	F	70	del11q
11	N	78	del11q
12	N	58	tri12
13	F	49	del17p
14	N	76	del17p
15	N	50	nincs eltérés

del, delécio; F, férfi; FISH, fluoreszcens in situ hibridizáció; N, nő; tri, triszómia

III.2.1. Lézermikrodisszekció

A 15 CLL/SLL-es FFPE nyirokcsomó biopsziás mintából mikrotómmal speciális UV-kezelt (254 nm-es UV fény, 30 percig) membrános lemezre (Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jéna, Németország) 2-2 db félvékony metszetet készítettünk. A metszeteket 100%-os xilol, majd leszálló etanol sor segítségével deparaffináltuk. Ezután a metszeteket nukleáz mentes desztillált vízzel öblítettük, majd metilénkéssel festettük.

Leica lézer mikrodisszektor segítségével kb. 5-5000 sejtet izoláltunk a PF-okból és az IF terekből a gyártó előírásának megfelelően. Az izolált sejteket Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, és a további felhasználásig (2-3 napig) -70 °C-os hőmérsékleten tároltuk.



9. ábra. A mikroRNS expresszió vizsgálatának folyamata. A mikroRNS expresszió vizsgálatához először a CLL/SLL nyirokcsomókból lézermikrodisszekció segítségével PF és IF területeket szeparáltunk, majd az összegyűjtött sejtekből RNS-t izoláltunk. Az RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk, majd preamplifikációt követően elvégeztük a valós-idejű PCR reakciót. A relatív expressziós szinteket ΔC_t módszer segítségével határoztuk meg. Rövidítések: IF, interfollikuláris tér; LCM, lézermikrodisszekció; PF, pszeudofollikulus; preamp, preamplifikáció; RT, reverz transzkripció; qRT-PCR, kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció

III.2.2. RNS izolálás

A mikrodisszekció során szeparált PF és IF területekből származó tumorsejtekből teljes RNS izolálást végeztünk a RecoverAll™ Kit (Life Technologies) segítségével a gyártó utasításai szerint.

Először 400 μ l emésztő puffert (Digestion Buffer) és 4 μ l proteázt mértünk a csövekbe. Óvatos keverés után 3 órán keresztül 50 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Inkubálás után 480 μ l Isolation Additive-ot mértünk a mintákhoz. Vortexelést követően 1,1 ml 100%-os etanolt mértünk a mintára és óvatosan megkevertük. A gyűjtőcsövekbe filtert helyeztünk, a filterekre a mintákból 700-700 μ l-t pipettáztunk. A csöveket 10 000 g fordulatszámon 30-60 másodpercig centrifugáltuk, hogy az anyag a filteren áthaladjon. A filtert kivéve a cső alján összegyűlő folyadékot eltávolítottuk. Ezeket a lépéseket addig ismételtük, míg a minta egészét átszűrtük a filteren. Ezután 700 μ l Wash 1 mosófolyadékot mértünk az oldatra. 30 másodpercig tartó centrifugálás következett 10 000 g-vel. 500 μ l Wash 2/3 mosófolyadékot pipettáztunk a filterre és azonos körülmények között ismét centrifugáltunk. DN-áz mixet készítettünk: mintánként 6 μ l 10x DN-áz puffert, 4 μ l DNázt és 50 μ l nukleáz mentes vizet mértünk össze. A mixből minden filterre 60 μ l-t mértünk egyenként, majd ezt követően szobahőn

30 perces inkubálás következett. Újabb 700 µl Wash 1-et mértünk a filterre, 30-60 másodpercig inkubáltunk, majd 30 másodpercig 10 000 g-vel centrifugáltunk. Ismételten 500 µl Wash 2/3 oldatot mértünk a filterre, 30 másodpercig centrifugáltunk, majd ezt a lépést megismételtük. Mindezek után 10 000 g-vel 1 percen át centrifugáltunk és a cső alján összegyűlt folyadékot leöntöttük, míg végül az összes folyadék eltávolításra került. Végezetül a filtert új gyűjtőcsőbe helyeztük, a filter közepére 60 µl Elution Solution elúciós oldatot pipettáztunk és 1 percig maximum sebességgel centrifugáltunk. A reverz transzkripcióig -70 °C-os hőmérsékleten tároltuk a mintákat.

III.2.3. Reverz transzkripció

Az izolált teljes RNS-ből a vizsgálni kívánt miRNS-ek cDNS-sé történő átírásához először ún. primer poolt készítettünk. A primer pool tartalmazta a vizsgálandó miRNS-ek specifikus reverz transzkriptáz primerét, amelynek különleges, stabil, ún. „stem-loop” szerkezete van. A stem-loop primer megnöveli a szintetizálódó cDNS hosszát, és optimalizálja az olvadási hőmérsékletet [195]. Vizsgálatainkhoz referencia, vagy ún. háztartási („house-keeping”) génként az RNU48 és U6 snRNS-eket használtunk, mert ezek expressziója a lymphoid szövetekben egyenletes [12, 119, 195, 196]. A primer pool összetétele az assay azonosítókkal az 5. táblázatban található.

A következő lépés a reverz transzkriptáz mix elkészítése volt. Ennek összetétele 1 mintára vonatkoztatva a 6. táblázatban látható. Az összemérés során 12,5%-os veszteséggel számoltunk.

A reverz transzkriptáz reakció mixből esetenként 10,99 µl-t mértünk az eddig -70 °C-os hőmérsékleten tárolt RNS mintákhoz (4,01 µL) majd a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies) készülékkel elvégeztük a reverz transzkripciót. A folyamathoz szükséges RT hőprofil a 7. táblázatban látható. A szintetizált mintákat a további felhasználásig -70 °C-os hőmérsékleten tároltuk.

III.2.4. Preamplifikáció

Mintáink RNS tartalma alacsony volt, ezért előszorozást (preamplifikációt) végeztünk a TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems) segítségével.

Ehhez első lépésként a vizsgálandó miRNS-ek specifikus primereit tartalmazó preamplifikációs primer poolt készítettünk. Az 5. táblázatban felsorolt primereket használtuk, a 21 különböző 20x TaqManAssay miR 2,5 µl-jét 250 µl végkoncentrációban.

5. Táblázat. Reverz transzkriptáz primer pool

<i>Reverz transzkriptáz primer pool</i>	<i>µl</i>
5x RT primer miR-155 (Assay ID 002623)	5
5x RT primer miR-150 (Assay ID 002637)	5
5x RT primer miR-29c (Assay ID 000587)	5
5x RT primer miR-26a (Assay ID 000405)	5
5x RT primer miR-181a (Assay ID 000480)	5
5x RT primer miR-21 (Assay ID 000397)	5
5x RT primer miR-15a (Assay ID 000389)	5
5x RT primer miR-16 (Assay ID 000391)	5
5x RT primer miR-34a (Assay ID 000426)	5
5x RT primer miR-221 (Assay ID 000524)	5
5x RT primer miR-222 (Assay ID 002276)	5
5x RT primer miR-223 (Assay ID 002295)	5
5x RT primer miR-101 (Assay ID 002143)	5
5x RT primer miR-93-5p (Assay ID 001090)	5
5x RT primer miR-650 (Assay ID 001603)	5
5x RT primer miR-92 (Assay ID 000431)	5
5x RT primer miR-142-3p (Assay ID 000464)	5
5x RT primer miR-142-5p (Assay ID 002248)	5
5x RT primer miR-15b (Assay ID 000390)	5
5x RT primer RNU-48 (Assay ID 001006)	5
5x RT primer U6 snRNS (Assay ID 001973)	5
1x TE	395
Összesen	500

miR, mikroRNS; RT, reverz transzkriptáz; snRNS, small nukleotid RNS; TE, Tris-EDTA

6. Táblázat. Reverz transzkriptáz reakció mix

<i>Reverz transzkriptáz reakció mix</i>	<i>1 minta (μl)</i>
RT primer pool	6,00
dNTPs with dTTP (100 mM)	0,30
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/μL)	3,00
10X RT Buffer	1,50
RNase Inhibitor (20 U/ μL)	0,19
Total Mix	10,99

7. táblázat. RT hőprofil

16 °C	30 perc
42 °C	30 perc
85 °C	5 perc
4 °C	∞

A 8. táblázatban látható a preamplifikációs reakció mix 1 mintára vonatkoztatva. Az elkészítésénél 12,5%-os veszteséggel számoltunk.

8. Táblázat. Preamplifikációs reakció mix

<i>Preamplifikációs reakció mix</i>	<i>1 minta (μl)</i>
TaqMan PreAmp MM (2x)	12,5
PreAmp primer pool	3,75
Nukleáz mentes víz	6,25
Total Mix	22,5

Következő lépésként a cDNS mintáinkból 2,5 μl-t mértünk össze 22,5 μl preamplifikációs reakció mix-szel egyenként. A 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies) készülék segítségével elvégeztük az előszorozítást a 9. táblázatban szereplő hőprofil mellett.

9. Táblázat. A preamplifikáció hőprofilja

95 °C	10 perc	-
55 °C	2 perc	-
72 °C	2 perc	-
95 °C	15 m.perc	12 ciklus
60 °C	4 perc	
99,9 °C	10 perc	-
4 °C	∞	

m-perc, másodperc

A folyamat végén a mintákhoz 175 µl 1x Tris-EDTÁ-t (TE) adtunk egyenként, majd a hígított mintákat -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

III.2.5. Kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció

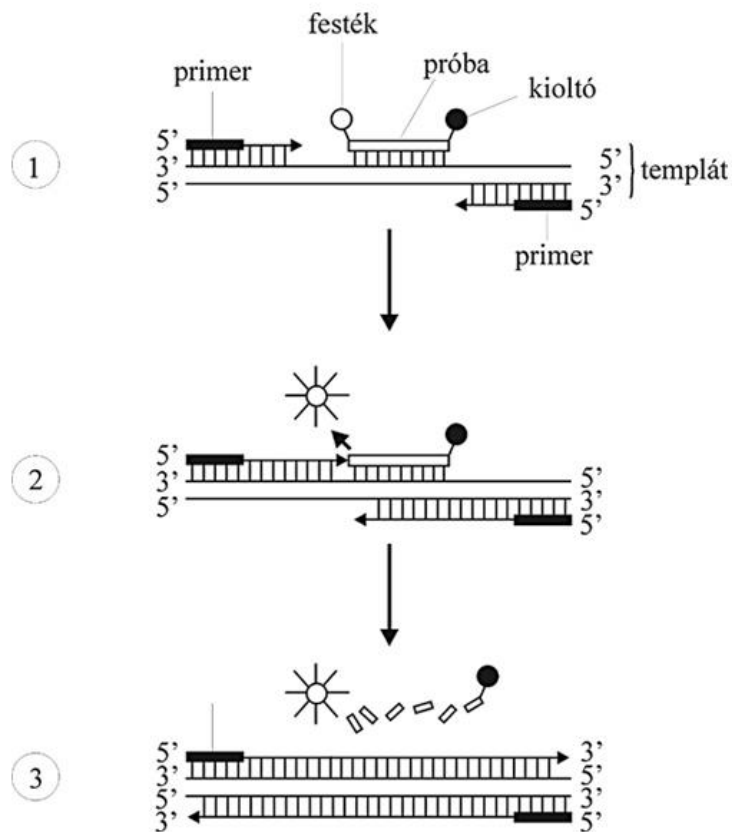
A miRNS-ek relatív expressziójának meghatározásához kvantitatív RT-PCR reakciót végeztünk az ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) készülék segítségével.

A TaqMan® próba körülbelül 15-30 bázispárból álló oligonukleotid. A próba 3' végén ún. „quencher” nem-fluoreszcens („kioltó”) molekula, míg 5' végén ún. „reporter” fluoreszcens („festék”) molekula található. A TaqMan® próba a target génszakasszal komplementer, nagyjából a génszakasz középső részéhez kötődik. A „reporter” és a „quencher” molekulák fizikai közelsége miatt a „quencher” kioltja a „reporter” fluoreszcenciáját mindaddig, amíg a próba intakt. A reakció a folyamat során olyan 5' exonukleáz aktivitással rendelkező DNS polimeráz enzimet használ, mely a próbát el tudja hasítani. A hasításkor a két fluorokróm annyira távol kerül egymástól, hogy a „quencher” molekula gátló hatása megszűnik és a „reporter” molekula által kibocsátott fluoreszcens jel detektálhatóvá válik. Ez a folyamat csak akkor megy végbe, ha a próba tud kötődni a target régióhoz, és a reakció során amplifikálódik. A kvantitatív RT-PCR reakció elméleti alapja a 10. ábrán látható [197]. A detektálható jel mind a keletkező PCR termék mennyiségével, mind az átírt cDNS mennyiségével, mind a mintában levő RNS mennyiségével arányos.

A qRT-PCR során minden mintából 2 párhuzamos reakciót készítettünk. Először az RT-PCR reakció mixet mértük össze (10. táblázat), majd összeállítottuk a RT-PCR reakcióelegyet (11. táblázat).

Belső kontrollként RNU-48 és U6 snRNS-t használtunk minden esetben. A reakció hőprofilja a 12. táblázatban olvasható.

A qRT-PCR során nyert adatokat a Sequence Detection Software version 1.3 (Applied Biosystems) programmal elemeztük. A kiértékelés során az eredményeket ún. „threshold cycle” (Ct) értékek formájában kaptuk. A Ct érték azt a ciklus számot jelöli, ahol a relatív fluoreszcencia-szint eléri az általunk megadott küszöbértéket. Ez a reakció első, exponenciális szakaszában történik meg. Ebben a szakaszban az amplifikáció hatékonysága még nagy és konstans (11. ábra).



10. ábra. A kvantitatív RT-PCR reakció elméleti alapja. 1. A primerpár bekötődik az amplifikálandó génszakasz két végéhez, a próba pedig a génszakaszon belül az egyik szálhoz. Fluoreszcens jel nem detektálható; az R és a Q molekulák közel vannak egymáshoz. 2. A reakció előrehaladtával a DNS polimeráz enzim az 5' exonukleáz aktivitása segítségével hasítja a próbát, így megszűnik a Q molekula gátló hatása. 3. Az R molekula fluoreszcenciája erősödik, detektálhatóvá válik [197].

10. Táblázat. RT-PCR reakció mix

<i>RT-PCR reakció mix</i>	<i>1 minta (μl)</i>
Hígított PreAmp product (cDNS)	0,2
TaqMan Universal MasterMix II, No AmpErase, UNG (2x)	10
Nukláz mentes víz	8,8
Total Mix	19

11. Táblázat. RT-PCR reakcióelegy

<i>RT-PCR reakció</i>	<i>1 minta (μl)</i>
RT-PCR reakció mix	19
20x TaqMan Assay miR	1
Total Mix	20

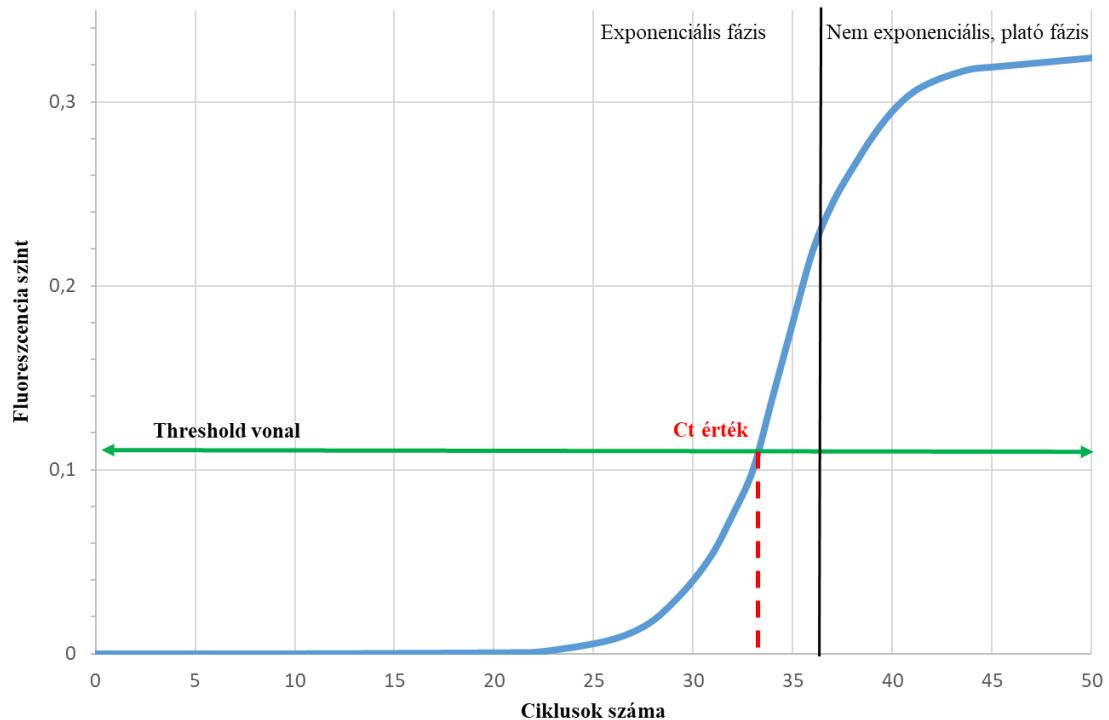
12. Táblázat. RT-PCR hőprofil

10 perc	95 °C	-
15 m.perc	96 °C	50
60 m.perc	60 °C	ciklus

m.perc, másodperc

Minél nagyobb a miRNS kiindulási koncentrációja, annál alacsonyabb ciklusszám mellett lehet a fluoreszcenciát detektálni, azaz minél kisebb a Ct érték, annál nagyobb volt a miRNS-ek mennyisége.

A kiértékelésnél a két párhuzamos reakció Ct értékeinek átlagát határoztuk meg és a továbbiakban az átlag Ct értékekkel számoltunk (az egyszerűség kedvéért Ct-vel jelöljük az átlag Ct értéket is). A vizsgálatok során használt két referencia gén (RNU-48 és U6 snRNS) közül az U6 snRNS expressziója egyenletesebb eloszlást mutatott, ezért a további számításoknál belső kontrollként ez



zel számoltunk. A kontrollhoz való normalizálás lényege, hogy elkerüljük az egyes minták kiindulási mennyiségei közötti eltérésekből adódó különbségek valós értéként való kezelését.

Következő lépésként kiszámoltuk a delta Ct (ΔCt) értékeket minden mintára (15 eset PF és IF területei), vagyis minden egyes miRNS Ct értékét kivontuk a belső kontrollként használt U6 snRNS Ct értékéből mintánként:

$$\Delta Ct_{(minta_IF)} = Ct_{U6(minta_IF)} - Ct_{miR(minta_IF)}$$

$$\Delta Ct_{(minta_PF)} = Ct_{U6(minta_PF)} - Ct_{miR(minta_PF)}$$

Ez a relatív érték mutatja, hogy az adott miRNS egy mintában a belső, stabilan expresszálódó kontrollhoz képest milyen mértékben expresszálódik.

Mivel a PF és IF területek közötti expresszió különbségekre voltunk kíváncsiak az egyes eseteken belül, és ezt jól reprezentálja egy adott eset PF és IF régiójának ΔCt értéke közötti eltérés, a továbbiakban a ΔCt értékekkel számoltunk. Az eredmények ábrázolásánál is az irodalmi ajánlások alapján a ΔCt értékeket tüntettük fel [198, 199].

III.3 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzéséhez Novolink™ (Novocastra) rendszert használtunk.

15 pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es nyirokcsomó FFPE biopsziás mintából 5µm vastagságú metszeteket készítettünk. A metszeteket xilol oldattal, majd leszálló etanol alkohol sor segítségével deparaffináltuk. Az antigénfeltárást hagyományos kuktában végeztük citrát pufferben (pH= 6,1), összesen 42 percig. TBS-sel történő öblítés után az endogén peroxidáz gátlása céljából a metszeteket 15 percig 1,5%-os H₂O₂ metanolos oldatába tettük. Újabb TBS öblítést követően az aspecifikus antitest-kötődés elkerülése végett a kit „Protein Block” komponensével inkubáltuk a metszeteket 10 percig. Ezután 2x5 perces TBS-sel való mosás következett, majd a 13. táblázatban lévő antitesteket használtuk az ott látható hígításban. Az elsődleges antitesteket egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap újabb 2x5 perces TBS-es öblítés után a „Post Primary” komponenssel 30 percig inkubáltunk. Újabb öblítés következett, majd utána a „Novolink™ Polymer” komponenssel 30 percig inkubáltuk metszeteinket. TBS-el történő öblítés után az immunreakciót a DAB (diaminobenzidin) szubsztrát/kromogén kit segítségével hívtuk elő 2 perces inkubálás után. Végül hematoxin festékekkel festettük meg a sejtmagokat.

13. Táblázat. Az immunhisztokémiai reakció végrehajtása során alkalmazott antitestek és hígításaik.

Antitest	Típus	Klón	Gyártó	Hígítás
EZH2	Egér monoklonális	Clone 11	BD Biosciences, USA	1:25
E2F1	Egér monoklonális	Clone KH95	Abcam	1:50
(p)Rb	Egér monoklonális	Clone 1F8	Thermo Scientific	1:50
C-MYC	Nyúl monoklonális	Clone Y69	Abcam	1:50

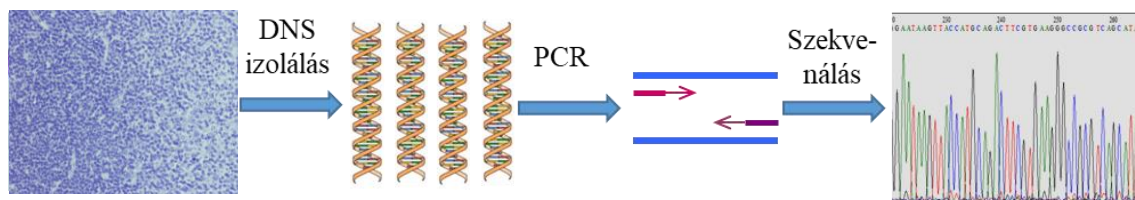
A metszeteket a Panoramic 250 Flash II nagy felbontású scannerrel (3DHISTECH Ltd.) digitálisan szkenneltük, majd a Panoramic Viewer software 1.15.4 (3DHISTECH Ltd.) NuclearQuant programja segítségével értékeltük ki. Számos, prolymphocytát és paraimmunoblastot tartalmazó PF, valamint kis lymphocytákat tartalmazó IF területet jelöltünk ki. A kijelölt PF és IF területeken belül külön-külön 2500-2500 sejtben értékeltük a magpozitív reakciókat. A +, ++ és +++ intenzitású pozitivitást egyaránt pozitív reakcióként értékeltük.

III.4 Az *IgHV* és *EZH2* gének szekvencia vizsgálata

Az *IgHV* és *EZH2* (16-os és 18-as exon, ismert aktiváló mutációk) gének mutációs státuszát direkt szekvenálással vizsgáltuk meg, mely során a DNS izolálást követő PCR amplifikáció után következett a Sanger-féle szekvenálás. A munka menetét a 12. ábra foglalja össze.

III.4.1. DNS izolálás

A nyirokcsomókból genomális DNS-t izoláltunk a RecoverAll Kit (Ambion, Life Technologies) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. Az Eppendorf csövekbe metszett mintákhoz 100%-os xilolt adtunk, elkevertük, majd 3 percig 50 °C-on inkubáltuk. Ezt 2 perces centrifugálás követte maximális sebességgel, majd a xilolt leöntöttük. 2x1 ml 100%-os etanollal mostuk a pelletet. Szobahőn történő szárítás után a maradék etanolt eltávolítottuk. Ezután mintáinkhoz hozzáadtuk az emésztő puffert (Digestion Buffer) és a proteázt. Ezt 16 órás inkubáció követte. Ezután a mintákhoz 120 µl Isolution Additive-t és 275 µl 100%-os etanolt adtunk. Az elegyet jól összekevertük, így fehéres zavaros oldatot kaptunk. A gyűjtőcsövekbe egy-egy filtert helyeztünk és pipettával minden mintából 700 µl-t mértünk a filterre. 10 000 g-vel 30 másodpercig centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. 700 µl Wash I mosófolyadékkal öblítettünk, 30 másodpercig 10 000 g-vel centrifugáltunk, majd leöntöttük az összegyűlt folyadékot. Ezután 500 µl Wash 2/3 folyadékot adtunk a mintához, majd újabb centrifugálás után ismét leöntöttük a folyadékot.



12. ábra. A mutáció analízis folyamata. A mutációk analíziséhez először a nyirokcsomó mintákból DNS-t izoláltunk, majd az általunk vizsgálni kívánt gén régiókat PCR technikával amplifikáltuk. A megtisztított termékeket kapilláris elektroforézissel megszekvenáltuk, majd a kapott szekvenciákat kielemeztük. Rövidítések: PCR, polimeráz láncreakció.

A következő lépés az RN-áz mix elkészítése volt. A 10 µl RN-ázhoz adtunk 50 µl nukleáz mentes vizet, 1 mintára vonatkozólag. A mintákat a hozzáadott RN-áz mix-szel 30 percig inkubáltuk szobahőn. Újabb 700 µl Wash I hozzáadása után 1 perces szobahőn történő inkubálás következett. Utána centrifugálás, az összegyűlt folyadék eltávolítása, majd ismét a Wash 2/3 folyadékkal való mosás és centrifugálás következett a fentebb leírt módon. A filtert új gyűjtőcsőbe helyeztük. 60 µl előzetesen 95 °C-ra melegített Elution Solution-t (eluáló oldatot) mértünk a filterre, majd 1 percig inkubáltuk szobahőn. Végül 1 percig maximális sebességgel centrifugáltunk. Az így izolált DNS-mintákat a további felhasználásig 4 °C-on tároltuk. A 15 esetből 14-ben tudtunk DNS-t izolálni, az egyik mintából (15. eset) a DNS izolálás sikertelen volt a rendelkezésre álló kis mennyiségű szövet miatt.

III.4.2. Az *IgHV* és *EZH2* gének PCR amplifikációja

Mind az *IgHV*, mind az *EZH2* gén PCR amplifikációjához az AmpliTaq Gold® kitet (Applied Biosystems) használtuk, a reakciók az Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life technologies USA) PCR készülékben zajlottak le. A PCR reakciókhoz 1 µl DNS templátot használtunk 25 µl végtérfogatban. A PCR reakció összetétele 1 mintára a 14. táblázatban látható.

14. Táblázat. A PCR reakció összetétele

Komponens	mennyiség/cső
AmpliTaq Gold mix	12,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Desztillált víz	9,5 µl

Az *IgHV* gének PCR amplifikációjához sense primerként az *IgH* gén 1. "framework" (FR1) régiójára tervezett *IgHV* géncsaládokra (VH1-6) specifikus primereket, és antisense primerként az *IgH* variábilis régiójának kapcsolási részére (J_H) tervezett konszenzus primert használtuk [200]. A PCR reakció során kb. 300-400 bázispár hosszúságú termékeket kaptunk az adott mintában detektálható *IgHV* géncsalád típusától függően. A PCR termék tartalmazta az *Ig* gén FR1, CDR1, FR2, CDR2 és FR3

régióit. Az amplifikációt először a CLL-ben ismerten gyakrabban jelen lévő VH1, -3 és -4 régiók primereivel végeztük el. Mivel minden esetünkben e 3 régió valamelyike kimutatható volt, a további, VH2, -5 és -6 régiók primereivel amplifikációt és következményes szekvenálást nem végeztünk. A reakciókhoz használt primerek szekvenciája és olvadáspontja a 15. táblázatban található.

15. táblázat. Az *IgHV* gén amplifikációjánál és szekvenálásánál alkalmazott primerek szekvenciája és olvadáspontja

gén régió	primer szekvencia	olvadáspont
VH1-FR1	5'-GGC CTC AGT GAA GGT CTC CTG CAA G-3'	63 °C
VH3-FR1	5'-CTG GGG GGT CCC TGA GAC TCT CCT G-3'	66 °C
VH4-FR1	5'-CTT CGG AGA CCC TGT CCC TCA CCT G-3'	65 °C
J _H consensus	5'-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3'	54 °C

Az *EZH2* gén vizsgálni kívánt 16-os és 18-as exonjának amplifikációjához primereinket az Integrated DNA Technologies (IDT) PrimerQuest Tool programja segítségével terveztük és a Bio-Science Kft.-n keresztül az IDT-től rendeltük. A primerek szekvenciája és olvadáspontja a 16. táblázatban olvasható.

16. Táblázat Az *EZH2* gén amplifikációjánál és szekvenálásánál alkalmazott primerek szekvenciája és olvadáspontja

gén régió	primer szekvencia
EZH2 E16 F	5'-CTA-TTG-CTG-GCA-CCA-TCT-GA-3'
EZH2 E16 R	5'-CAG-TGC-CTT-ACC-TCT-CCA-CA-3'
EZH2 E18 F	5'-TCA-CTG-GGC-TGT-GCT-TAC-TTT-3'
EZH2 E18 R	5'-CCT-TTT-GCA-TAG-CAG-TTT-GGA-3'

A PCR amplifikációs reakciók hőprofiljait a 17. táblázat mutatja be. Az anellációs hőmérsékletet a primerek olvadáspontjának figyelembevételével határoztuk meg. Az anellációs hőmérséklet az *IgHV*-1 és -3 esetében 58 °C, *IgHV*-4 esetében 55 °C, *EZH2* exon 16 és 18 esetében 58 °C volt.

17. táblázat. Az *IgHV* és *EZH2* génamplifikáció hőprofilja

lépés	hőmérséklet	idő	ciklus
kezdeti denaturáció	95 °C	10 perc	-
denaturáció	95 °C	30 m.perc	35
anelláció	55/58 °C	45 m.perc	
extenzió	72 °C	45 m.perc	
végső extenzió	72°C	5 perc	-

m.perc, másodperc

III.4.5. A polimeráz láncreakció során nyert termék detektálása

Az amplifikált termék elválasztása és detektálása agaróz-gélelektroforézissel történt. A futtatáshoz 2%-os, GelRed®-et tartalmazó agaróz gél készítettünk (2 g agaróz, 100 ml 1x TAE puffer, 2 µl GelRed®). Futtató pufferként 1x TAE oldatot (10X TAE törzsoldat: 0,4 M TRIS, 0,2 M ecetsav, 0,01 M EDTA) használtunk. A futás 120 V feszültségen zajlott 50 percig. A migrációs mintázat detektálását a Kodak 4400 MM (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) gél dokumentációs rendszerrel végeztük.

III.4.6. A polimeráz láncreakció során nyert termék tisztítása

A tisztítási lépés lényege, hogy a reakcióelegyből eltávolítsuk a feleslegben megmaradt és a továbbiakban zavaró komponenseket (dNTP-k, primerek). A PCR termékek tisztításához az enzimatis ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific) módszert alkalmaztuk, a gyártó előírásai szerint. A reakció során a feleslegben maradt nukleotidok és primerek hidrolízissel bomlanak le. Mintánként 5 µl PCR termékhez 2 µl ExoSAP reagenst mértünk. A reakciók az Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life technologies USA) készülékben zajlottak le, a következő hőprofillal: 37°C 15 perc és 80°C 15 perc. A tisztított terméket további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

III.4.7. A szekvenáló reakció

A szekvenáló reakcióhoz a Big Dye Terminátor 3.1 (Applied Biosystems) kitet használtuk, a gyártó előírásai szerint. A PCR termékek direkt szekvenálását mindkét irányból elvégeztük.

A szekvenáló reakció (cycle sequencing) egy egyirányú PCR reakció és a Sanger-féle dideoxi elven alapul. A 4 féle dideoxi nukleotid 4 különböző fluoreszcens festékkel jelölt. A reakció során a DNS-polimeráz enzim a 2'-3' dideoxi nukleotidokat is beépíti a láncba, és ahol egy dideoxi analóg beépül, ott a DNS szintézis terminálódik. Ennek oka, hogy a dideoxi nukleotidnak nincs 3'-OH csoportja, így a soron következő nukleotid nem tud (a foszfátkötéssel) hozzákapcsolódni. Ennek megfelelően a reakció során különböző hosszúságú DNS fragmentek keletkeznek, melyek utolsó eleme fluoreszcens festékkel jelölt dideoxi nukleotid.

A szekvenáló reakció az Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life technologies USA) készülékben zajlott. A reakció pontos összetétele és az amplifikáció hőmérsékleti paraméterei a 18. illetve a 19. táblázatban láthatóak. A szekvenáláshoz is a 15. és 16. táblázatban feltüntetett primereket használtuk. A szekvenálási reakció után 10 µl steril desztillált vizet mértünk az elegyre; a mintákat további felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

18. Táblázat. A szekvenáló reakció összetétele

összetevők	menyiség/cső
BigDye Terminator	0,25 µl
BigDye Puffer	1,875 µl
Víz	6,375µL
primer (10 µm)	0,5 µl
PCR termék	1 µl

19. Táblázat. A szekvenáló reakció hőprofilja

lépés	hőmérséklet	idő	ciklus
kezdeti denaturáció	94 °C	2 perc	-
denaturáció	94 °C	30 m.perc	25
anelláció	55/58 °C	15 m.perc	
extenzió	60 °C	4 perc	

m.perc, másodperc

III.4.8. A szekvenáló reakció termékeinek tisztítása

A feleslegben megmaradt, a kapilláris elektroforézist zavaró komponenseket ismét eltávolítottuk. Ehhez az EdgeBio Performa kitet (EdgeBio, USA) használtuk a gyártó előírásai szerint. A speciális oszlopokat 3 percig 850 g-vel centrifugáltuk. Utána az oszlopokat tiszta Eppendorf csövekbe helyeztük, és az előzőleg 20 µl-re kiegészített szekvenáló reakció terméket ráértük. Újabb 5 perces centrifugálás következett 850 g-vel. Az eluátum tartalmazta a tisztított cycle sequencing reakció terméket, melyet további felhasználásig 4 °C-on tároltunk.

III.4.9. Kapilláris elektroforézis és szekvencia analízis

Mintáinkat az ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) genetikai analizátor segítségével futtattuk le és analizáltuk. A nyers adatok értékeléséhez a BioEdit programot használtuk.

A futtatást 96-lyukú plate-en végeztük. A plate-be először 20-20 µl Formamid reagenst mértünk, majd hozzámértük a tisztított terméket. A mintákat 95 °C-on denaturáltuk 90 másodpercig, majd jégre helyeztük. Ezután következett a futtatás, melynek során a készülék kapilláris elektroforézissel analizálta a fluoreszcensen jelölt DNS fragmenteket. A fragmentek ún. „separation polymer” anyaggal telt kapillárisban haladnak a katódtól az anód felé. Amikor a DNS-fragment eléri a detektor-ablakot a kapillárisban, akkor lézer fény gerjeszti a fluoreszcens festéket és az emittált fény hullámhossza alapján elkülöníti az adott fluorokrómoknak megfelelő bázisokat.

A kapott *IgHV* gén szekvenciákat az IMGT/V-QUEST (International ImMunoGeneTics Information System) program segítségével hasonlítottuk az egészséges donoroktól származó germline gén szekvenciákhoz. Az *IgHV* gén szekvencia analízise során megkerestük a mintában előforduló *IgHV* génhez legközelebb álló germline gént.

Az *EZH2* gén szekvenciáit az NCBI (National Centre for Biotechnology Information) GenBank adatbázisban található, egészséges donoroktól származó referencia szekvenciákhoz hasonlítottuk.

Az elektroferogramokon a mutációk kettős csúcsok formájában jelentkeznek, azaz a vad és mutáns típust reprezentáló bázisok együttesen vannak jelen. Ennek az oka egyrészt, hogy a mutációk heterozigóta formában vannak jelen, másrészt hogy a tumorsejtek között vannak mutációt nem hordozó normál sejtek is.

III.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist az SPSS 20.0 verziójával végeztük, a grafikonokat Graphpad 5.0 segítségével szerkesztettük.

A vizsgált változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszt segítségével ellenőriztük. Normál eloszlású változók esetén a különböző csoportok közötti összehasonlítás során független mintás t-próbát alkalmaztunk, az összetartozó értékeket pedig páros t-próba segítségével elemeztük. Mindkét analízis során kétoldali próbát alkalmaztunk. Azon változók esetében, amelyek nem mutattak normál eloszlást, a csoportok közötti különbségeket Mann-Whitney U-teszt segítségével elemeztük, az összetartozó értékek vizsgálata során pedig Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. Szignifikánsnak tekintettük az eltérést, ha $p \text{ érték} \leq 0,05$ volt.

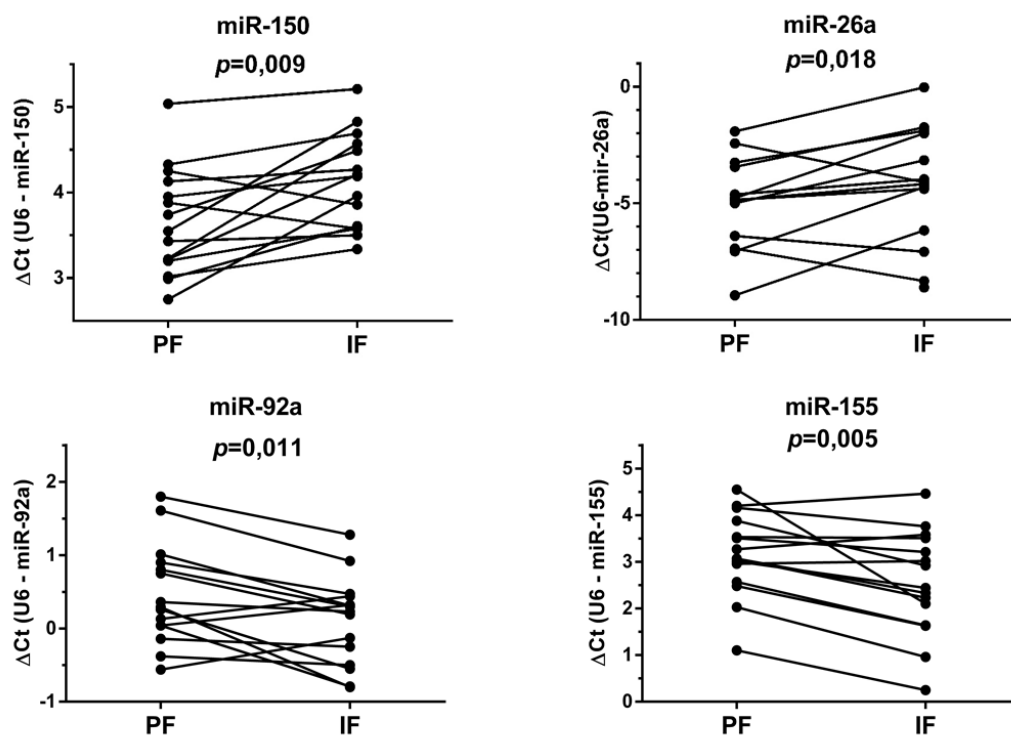
IV. EREDMÉNYEK

IV.1. MikroRNS expresszió a CLL/SLL-es nyirokcsomók pszeudofollikulusaiban és interfollikuláris tereiben

A CLL kialakulásával és/vagy progressziójával kapcsolatba hozható mikroRNS-ek közül 19 expresszióját hasonlítottuk össze 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó PF és IF területein, kvantitatív PCR reakció segítségével.

A relatív kvantifikáció eredményei (20. táblázat) alapján 4 miRNS esetében találtunk statisztikailag szignifikáns expresszió különbséget a PF régiókban az IF területekhez viszonyítva: miR-155 ($p=0,005$), miR-150 ($p=0,009$), miR-92a ($p=0,011$) és miR-26a ($p=0,018$) (13. ábra).

Az oncomiR-nek tartott miR-155 és miR-92a a PF-ekben szignifikánsan magasabb expressziót mutatott, míg a tumorszuppresszor miR-150 és miR-26a a PF-ekben alacsonyabb expressziót mutatott a környező IF területekhez képest (13. ábra).



13. ábra. A CLL/SLL-es nyirokcsomók pszeudofollikulusaiban szignifikánsan eltérő expressziót mutató miRNS-ek. A miR-150 és miR-26a a pszeudofollikulusokban (PF) alacsonyabb, míg a miR-155 és miR-92a a PF-ekben magasabb expressziót mutatott az interfollikuláris (IF) területekhez viszonyítva

20. Táblázat. A CLL/SLL-es nyirokcsomók PF és IF területein mért mikroRNS expressziók összehasonlítása.

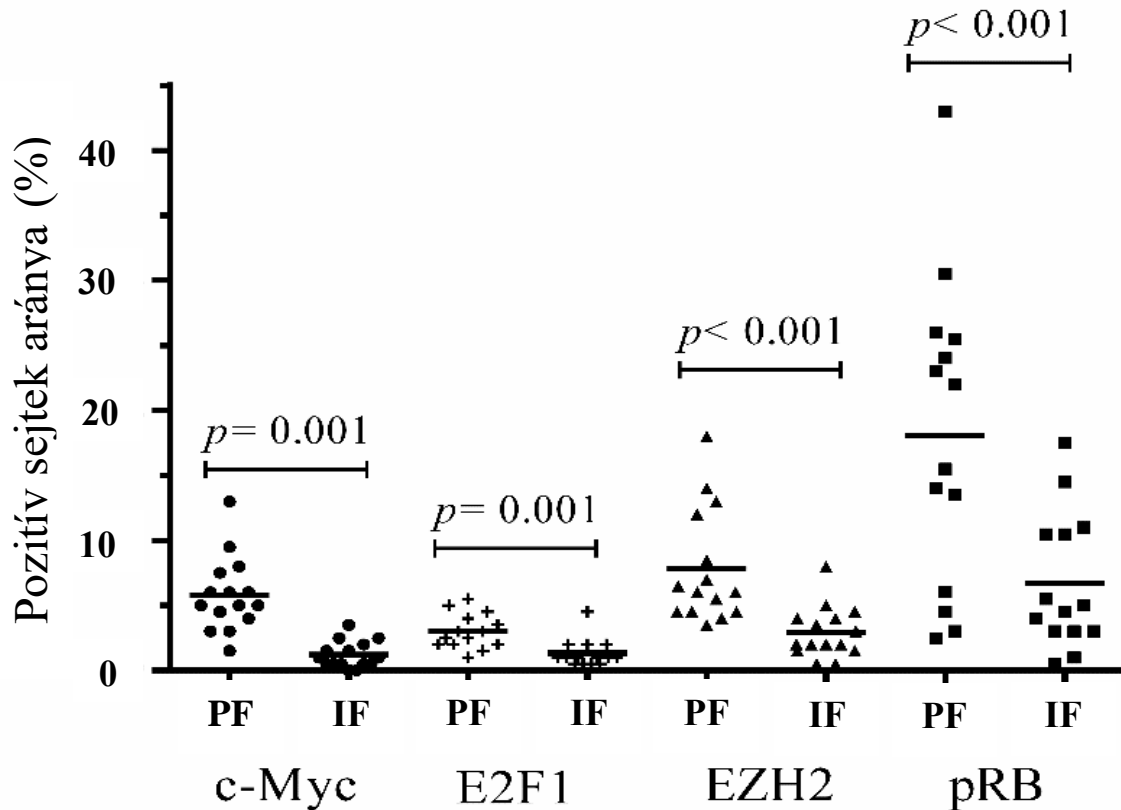
miR	PF	IF	p-érték
$\Delta\text{Ct miR-150}$	$3,65 \pm 0,62$	$4,13 \pm 0,56$	0,009
$\Delta\text{Ct miR-155}$	$3,16 \pm 0,90$	$2,54 \pm 1,13$	0,005
$\Delta\text{Ct miR-92a}$	$0,46 \pm 0,68$	$0,10 \pm 0,60$	0,011
$\Delta\text{Ct miR-26a}$	$(-5,34) \pm 2,38$	$(-4,28) \pm 2,53$	0,018
$\Delta\text{Ct miR-29c}$	$(-4,52) \pm 1,64$	$(-4,00) \pm 0,96$	0,166
$\Delta\text{Ct miR-181a}$	$(-6,73) \pm 0,95$	$(-9,65) \pm 3,73$	0,096
$\Delta\text{Ct miR-21}$	$(-2,22) \pm 1,09$	$(-2,54) \pm 1,28$	0,360
$\Delta\text{Ct miR-15a}$	$(-5,87) \pm 1,32$	$(-6,82) \pm 3,20$	0,615
$\Delta\text{Ct miR-16}$	$2,21 \pm 0,54$	$2,33 \pm 0,83$	0,493
$\Delta\text{Ct miR-34a}$	$(-6,94) \pm 5,84$	$(-6,39) \pm 5,24$	0,826
$\Delta\text{Ct miR-221}$	$(-4,96) \pm 0,74$	$(-6,39) \pm 2,22$	0,328
$\Delta\text{Ct miR-222}$	$(-0,44) \pm 1,22$	$(-0,43) \pm 0,88$	0,965
$\Delta\text{Ct miR-223}$	$(-1,01) \pm 0,79$	$(-0,86) \pm 0,78$	0,206
$\Delta\text{Ct miR-101}$	$(-1,28) \pm 2,21$	$(-2,57) \pm 2,88$	0,458
$\Delta\text{Ct miR-93-5p}$	$(-4,54) \pm 1,60$	$(-4,56) \pm 1,46$	0,944
$\Delta\text{Ct miR-650}$	$(-4,73) \pm 1,36$	$(-5,29) \pm 3,25$	0,563
$\Delta\text{Ct miR-142-3p}$	$1,10 \pm 0,60$	$0,98 \pm 0,72$	0,314
$\Delta\text{Ct miR-142-5p}$	$(-3,35) \pm 1,22$	$(-3,11) \pm 1,19$	0,402
$\Delta\text{Ct miR-15b}$	$(-4,34) \pm 1,53$	$(-3,60) \pm 0,63$	0,210

Az értékek átlag \pm SD formában vannak feltüntetve. A magasabb ΔCt értékek magasabb expressziót reprezentálnak. $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{U6}} - \text{Ct}_{\text{miR}}$; Ct, az a ciklus szám, ahol a relatív fluoreszcencia-szint eléri az általunk megadott küszöbértéket; IF, interfollikuláris tér; PF, pszeudofollikulus; p-érték, Student-féle t-teszt szerint.

IV.2. Az EZH2 fehérje, valamint az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expressziója CLL/SLL-es nyirokcsomók pszeudofollikulusaiban és interfollikuláris tereiben.

Az EZH2 és az EZH2 transzkripcióját szabályozó c-Myc, E2F1 és pRb expresszió szöveti eloszlásának tanulmányozásához immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintán. A megfestett és digitalizált metszeteken PF és IF területeket jelöltünk ki, és a területeken belül kvantifikáltuk a pozitív sejtek arányát. Az +, ++ és +++ intenzitású pozitív reakciókat egyaránt pozitívnak tekintettük. A digitális módszerrel kvantitáiban kiértékelt immunhisztokémiai vizsgálatok statisztikai eredményei a 21. táblázatban láthatóak. A szabadsági fokok számát „df” jelöli.

A vizsgálatok eredményeként szignifikánsan magasabb expressziót találtunk a PF-ek területén mind az EZH2 ($p < 0.001$), mind az őt szabályozó E2F1 ($p < 0.001$), c-Myc ($p < 0.001$) és pRb ($p < 0.001$) esetében az IF régiókhoz viszonyítva (14. ábra).

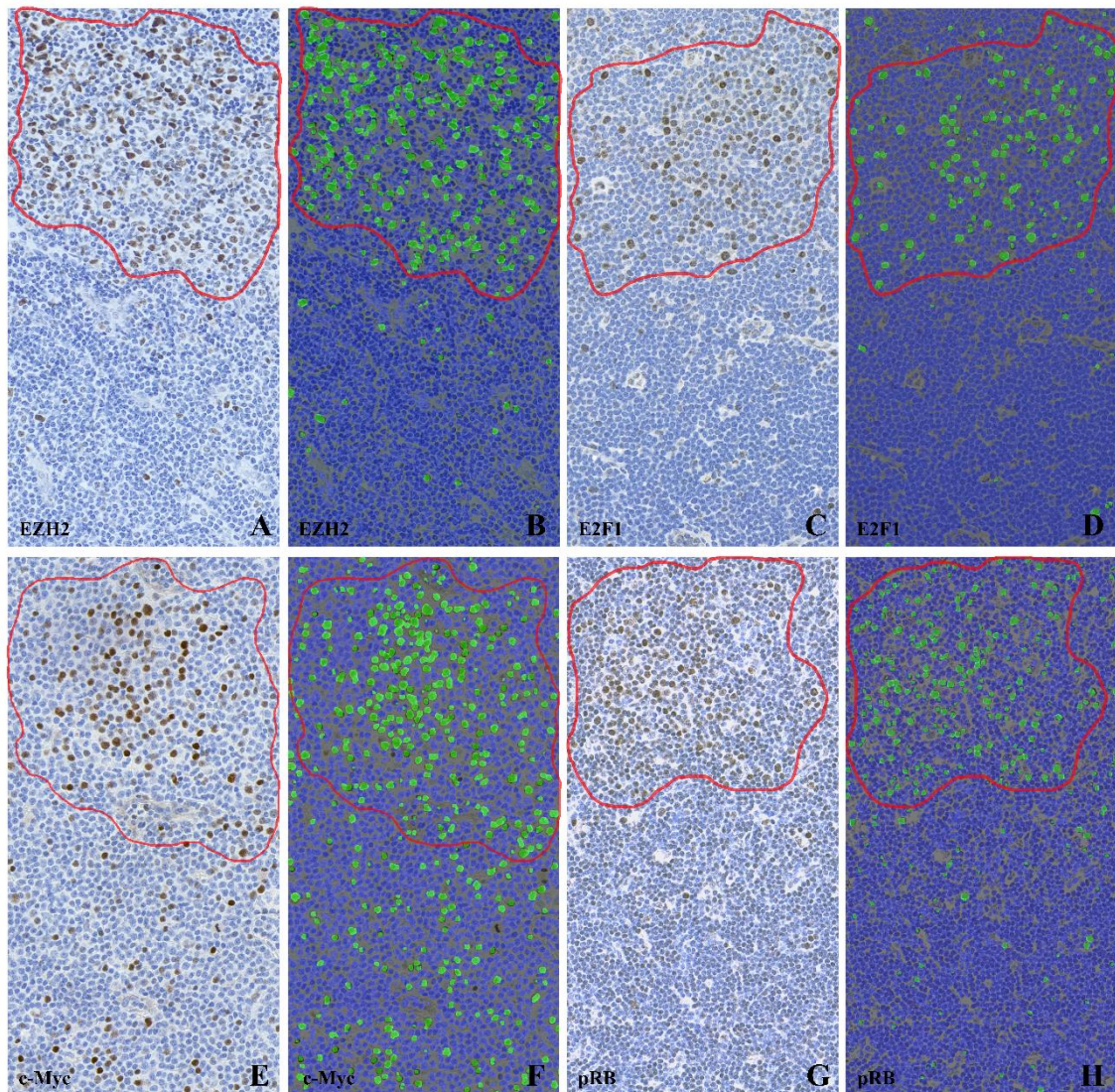


14. ábra. Az immunhisztokémiai vizsgálatok kvantitatív elemzésének eredménye. A vizsgált 15 CLL/SLL-es nyirokcsomóban a digitális analízis során a c-Myc, E2F1, EZH2 és pRb fehérjék expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PF területeken az IF régiókhoz viszonyítva. A vonalak az átlagértékeket reprezentálják.

21. Táblázat. A digitális módszerrel kvantitáívan kiértékelt immunhisztokémiai vizsgálatok statisztikai eredményei

		n	Átlag (%)±SD	df	p-érték
c-Myc	PF	15	11,63±5,83	14	p<0,001
	IF	15	2,47±2,07		
E2F1	PF	14	5,97±2,69	13	p<0,001
	IF	14	2,50±2,10		
EZH2	PF	15	15,56±8,57	14	p<0,001
	IF	15	5,88±3,95		
pRb	PF	14	36,12±23,50	13	p<0,001
	IF	14	13,29±10,51		

PF: pszeudofollikulus; IF: interfollikuláris terület, df: degree of freedom



15. ábra. Reprezentatív EZH2 (A, B), E2F1 (C, D), c-Myc (E, F) és pRb (G, H) immunfestett képek pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es betegek nyirokcsomó mintáiból. A digitális analízis alapján az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziója szignifikánsan nagyobb a pszeudofollikuláris (PF) területeken az interfollikuláris területekhez viszonyítva. A PF területeket az ábrán piros körvonalakkal emeltük ki. Az A, C, E és G képeken az eredeti festések digitalizált metszetei láthatók, a B, D, F és H képeken ugyanezek a régiók látszanak a digitális analízis után (400x-os nagyítás)

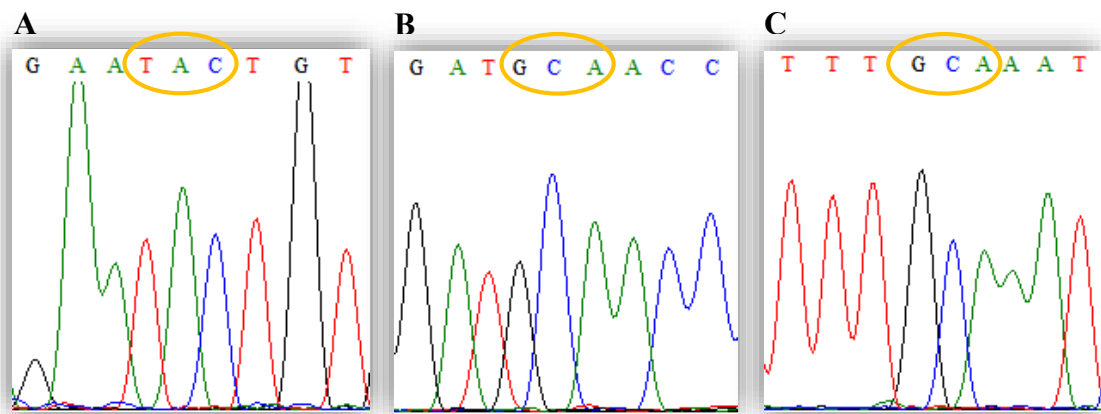
EZH2, E2F1, c-Myc és pRb immunfestett és digitalizált metszeteiről a 15. ábrán láthatók reprezentatív képek. Az ábrán az eredeti festés mellett feltüntettük a digitális kiértékelést követő képet is, ahol a pozitív reakciók zöld színnel, a negatív reakciók kék színnel jelöltek. A metszeteken a PF területek könnyen beazonosíthatók voltak a számos nagyobb sejt (prolymphocytá és paraimmunoblast) jelenléte alapján. Az IF területeken főként kis neoplastikus lymphocyták figyelhetők meg és csak elszórtan vannak jelen

prolymphocyták és paraimmunoblastok. A képeken jól látható, hogy többségében a nagyobb sejtek mutatnak pozitivitást.

IV.3. Az *EZH2* gén aktiváló mutációinak analízise

Az *EZH2* gén hotspot (Y646, A682 és A692) régióinak mutáció analízisét bidirekcionális Sanger szekvenálással végeztük el 14 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintából. A vizsgálat célja az volt, hogy felderítsük, hogy esetleg aktiváló mutáció tehető-e felelőssé az *EZH2* overexpresszióért.

A vizsgálatok során az *EZH2* gén 16-os és 18-as exonjaiban visszatérő mutációt nem tudtunk kimutatni (16. ábra).



16. ábra. Reprezentatív elektroferogramok az *EZH2* gén 16-os (A) és 18-as (B és C) exonjainak hotspot régióiból. A 14 CLL/SLL-es nyirokcsomó minta szekvenálása során nem azonosítottunk mutációt a 16-os (Y646 (A)) és 18-as (A682 (B) és A692 (C)) exonokban.

IV.4. Az *IgHV* gén szekvencia analízise

A 14 CLL/SLL-es esetben elvégzett *IgHV* gén mutációs vizsgálatának eredménye a 22. táblázatban látható. Az esetek két csoportra oszthatók az alapján, hogy mekkora a nukleotid eltérések száma a germline génekhez képest. Mutáltak tekintettük azokat a mintákat, amelyeknél a VH gének konszenzus szekvenciájával való egyezés kisebb, mint 98% (9. és 11. esetek) (17. ábra). A további esetek nem voltak mutáltak,

ezeknél a mintáknál a szekvencia legalább 98%-os homológiát mutatott a konszenzus szekvenciákkal (18. ábra). A három high-grade transzformációt mutató esetben (3., 4. és 6. esetek) az *IgHV* gén nem volt mutált.

22. Táblázat. A CLL/SLL esetek *IgHV* gén mutációs státusza

Eset száma	<i>IgHV</i> gén profil		
	legközelebbi germline gén	mutációk száma	szekvencia homológia (%)
1	IGHV1-69*13	1	99,6
2	IGHV1-2*02	0	100
3	IGHV1-69*06	2	99,2
4	IGHV1-69*13	1	99,6
5	IGHV1-24*01	1	99,6
6	IGHV1-2*02	0	100
7	IGHV3-13*05	0	100
8	IGHV3-66*03	0	100
9	IGHV3-23*01	20	91,9
10	IGHV3-48*03	1	99,6
11	IGHV3-30*03	22	91,1
12	IGHV4-30-4*01	2	99,2
13	IGHV4-59*01	0	100
14	IGHV3-66*01	4	98,4
15	nem elérhető	nem elérhető	nem elérhető

Closest V-REGIONS (evaluated from the V-REGION first nucleotide to the 2nd-CYS codon)

					Score	Identity
<u>M99663</u>	Homsap	IGHV3-30*03	F		1037	91.13% (226/248 nt)
<u>X92214</u>	Homsap	IGHV3-30*18	F		1037	91.13% (226/248 nt)
<u>L06616</u>	Homsap	IGHV3-30*19	F		1019	90.32% (224/248 nt)
<u>M77334</u>	Homsap	IGHV3-33*05	F		1019	90.32% (224/248 nt)
<u>L26401</u>	Homsap	IGHV3-30*02	F		1010	89.92% (223/248 nt)

Alignment with FR-IMGT and CDR-IMGT delimitations

11	VH3	<-----FR1-IMGT
M99663	Homsap IGHV3-30*03 F	cagggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagc---(a)---
X92214	Homsap IGHV3-30*18 F	cagggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagc---a---
L06616	Homsap IGHV3-30*19 F	cagggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagc---a---
M77334	Homsap IGHV3-33*05 F	cagggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagc---a---
L26401	Homsap IGHV3-30*02 F	cagggtgcagctggtggagtctggggga...ggcgtggtccagc---a---

[illegible]

11	VH3				- - - - - FR2-IMGT - - - - - >	CDR
M99663	Homsap	IGHV3-30*03	F	tgggtctcgccaggcttcaggcaagggcctgga	c t g c t g g g t g g c a g t a a t t t t a t a t g a t . . .	
X92214	Homsap	IGHV3-30*18	F	- - - - - g - - - - -	- - - - - t - a - c - - - - -	
L06616	Homsap	IGHV3-30*19	F	- - - - - g - - - - -	- - - - - t - a - c - - - - -	
M77334	Homsap	IGHV3-33*05	F	- - - - - g - - - - -	- - - - - t - a - c - - - - -	
L26401	Homsap	IGHV3-30*02	F	- - - - - e - - - - -	- - - - - t - t - a c g g - - - - -	

11 VH3 2-IMGT <-----
...gagagaagttaaattatgcagactccctgaag...ggcccgaattcaccatctccaga
M99663 Homsap IGHV3-30*03 F ...ga-t-a--c--g---
X92214 Homsap IGHV3-30*18 F ...ga-t-a--C---g---
L06616 Homsap IGHV3-30*19 F ...ga-t-a--C-C-g---
M77334 Homsap IGHV3-33*05 F ...ga-t-a--C---g---
L26401 Homsap IGHV3-30*02 F ...ea-t-a--C---g---

[illegible]

11	VH3		----->_____ CDR3-IMGT _____
M99663	Homsap	IGHV3-30*03 F	<u>gtgtattactgtgcgagagatagtgttattatcagtattactttgactactggggccag</u>
X92214	Homsap	IGHV3-30*18 F	-----a--
L06616	Homsap	IGHV3-30*19 F	-----
M77334	Homsap	IGHV3-33*05 F	-----
L26401	Homsap	IGHV3-30*02 F	-----a--

17. ábra. Reprezentatív ábra az IMGT/V-QUEST program segítségével kapott *IgHV* státusz eredményéről egy mutáns esetben. A mintához (11. eset) legközelebb álló *Ig* germline gén a VH3-30*03 (kék keretben). A minta 22 bázisban tér el ettől a szekvenciától, vagyis mutált. A „-” vonal a bázisok azonosságát jelzi, az eltéréseket piros keretekkel emeltem ki.

Closest V-REGIONS (evaluated from the V-REGION first nucleotide to the 2nd-CYS codon)

		Score	Identity
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	1215	100.00% (244/244 nt)
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	1210	99.59% (243/244 nt)
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	1206	99.59% (243/244 nt)
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	1197	99.18% (242/244 nt)
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	1179	98.36% (240/244 nt)

Alignment with [FR-IMGT](#) and [CDR-IMGT](#) delimitations

2	VH1	<----- FR1-IMGT ----->
X62106	Homsap IGHV1-2*02 Fggcctcagtggaag
X92208	Homsap IGHV1-2*03 Fggcctcagtggaagcctgg-----
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 Fggcctcagtggaagcctgg-----
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 Fggcctcagtggaagcctgg-----
X07448	Homsap IGHV1-2*01 Fggcctcagtggaagcctgg-----
2	VH1	----->----- CDR1-IMGT -----<-----
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	gtctcctgcaaggcttctggatacaccttc.....accggctactatgcac
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	-----
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	-----
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	-----
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	-----
2	VH1	----- FR2-IMGT ----->----- CDR
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	tgggtgacagggccctggacaaggcttgagtggaaggatggatcaaccctaac...
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	-----n-----
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	-----
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	-----c-----
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	-----c-----
2	VH1	2-IMGT -----<-----
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	...agtgggtggcacaactatgcacagaagtttcag...ggcagggtcaccatgaccagg
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	-----
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	-----t-----
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	-----
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	-----gt-----
2	VH1	----- FR3-IMGT -----
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	gacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcagctgagatctgacgacacggcc
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	-----
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	-----
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	-----t-----
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	-----t-----
2	VH1	----->----- CDR3-IMGT -----
X62106	Homsap IGHV1-2*02 F	gtgtattactgtaccaccaccacgatagcagcagctggtaccctactactactacggt
X92208	Homsap IGHV1-2*03 F	-----g-g-gaga
KF698733	Homsap IGHV1-2*04 F	-----g-g-gaga
HM855674	Homsap IGHV1-2*05 F	-----g-g-gaga
X07448	Homsap IGHV1-2*01 F	-----g-g-gaga

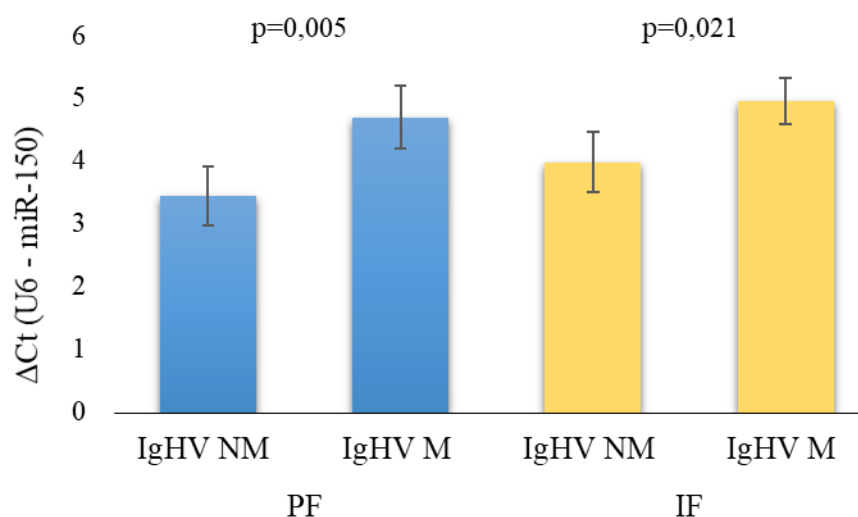
18. ábra. Reprezentatív ábra az IMGT/V-QUEST program segítségével kapott *IgHV* státusz eredményéről egy mutációt nem hordozó esetben. A mintához (2. eset) legközelebb álló *Ig* germline gén a VH1-2*02 (kék keretben). A minta nem tér el ettől a szekvenciától egy bázisban sem, vagyis nem mutált. A „-” vonal a bázisok azonosságát jelzi.

IV.5. A mikroRNS-ek, illetve az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése az *IgHV* mutációs státusszal

A fehérje és miRNS expressziós eredményeinket összevetettük a prognosztikai szempontból jelentős *IgHV* mutációs státusszal.

Azokban az esetekben, amelyekben az *IgHV* gén nem volt mutált szignifikánsan alacsonyabb miR-150 expressziót mértünk mind a PF, mind az IF területeken a mutált esetekhez viszonyítva. $\Delta Ct_{PC}miR-150_{IgHV_NM} = 3,45 \pm 0,47$, $\Delta Ct_{PC}miR-150_{IgHV_M} = 4,69 \pm 0,50$, $t = -3,42$, $p = 0,005$ és $\Delta Ct_{IF}miR-150_{IgHV_NM} = 3,98 \pm 0,48$, $\Delta Ct_{IF}miR-150_{IgHV_M} = 4,95 \pm 0,37$, $t = -2,67$, $p = 0,021$) (19. ábra).

A további miR-ek, illetve a vizsgált fehérjék expressziója és az *IgHV* gén mutációs státusza között szignifikáns összefüggést nem találtunk.



19. ábra. A miR-150 expressziója alacsonyabb a nem mutált *IgHV* gént tartalmazó esetekben. Szignifikánsan alacsonyabb a tumorsuppresszor miR-150 expressziója a pszeudofolikuláris (PF) és interfollikuláris (IF) terekben is a rosszabb prognózist reprezentáló nem mutált *IgHV* génnel rendelkező esetekben. M, mutált; NM, nem mutált.

IV.6. A mikroRNS-ek, illetve az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb fehérjék expressziójának összefüggése a kromoszóma eltérésekkel

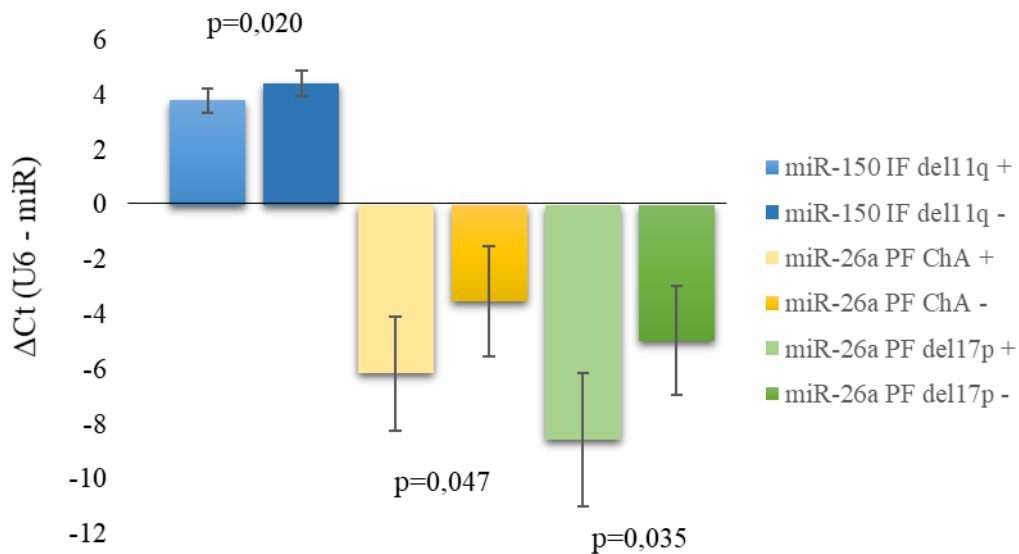
A fehérje és miRNS expressziós eredményeinket összevetettük a prognosztikai szempontból jelentős kromoszóma eltérésekkel (del13q, del17p, del11q és tri12).

Vizsgálataink szerint a 11q delécióval járó esetekben a miR-150 expressziója az IF területén szignifikánsan alacsonyabb volt ($\Delta Ct_{\text{IF miR-150 del11q+}} = 3,79 \pm 0,45$, $\Delta Ct_{\text{IF miR-150 del11q-}} = 4,42 \pm 0,48$, $t=2,66$, $p=0,020$) (19. ábra), míg a PF területén csupán hasonló tendenciát igazoltunk ($p=0,071$).

Kromoszóma aberráció(k) (ChA) jelenléte esetén szignifikánsan alacsonyabb a miR-26a expresszió a PF területén ($\Delta Ct_{\text{PF miR-26a ChA+}} = -6,15 \pm 2,08$, $\Delta Ct_{\text{PF miR-26a ChA-}} = -3,5 \pm 2,01$; $p=0,047$) (20. ábra).

Del17p jelenléte esetén is szignifikánsan alacsonyabb a miR-26a expressziója a PF-okban összehasonlítva a del17p eltérést nem mutató esetekkel ($\Delta Ct_{\text{PF miR-26a del17p+}} = -8,57 \pm 2,43$, $\Delta Ct_{\text{PF miR-26a del17p-}} = -4,96 \pm 1,99$; $p=0,035$) (20. ábra).

A további miR-ek, illetve a vizsgált fehérjék expressziója és a kromoszóma eltérések jelenléte között szignifikáns összefüggést nem találtunk.



20. ábra. MikroRNS expresszió összefüggése a kromoszóma eltérésekkel. Szignifikánsan alacsonyabb a tumorszuppresszor miR-150 expressziója az interfollikuláris (IF) terekben del11q jelenléte esetén, valamint a miR-26a expressziója a pseudofollikulusokban (PF) bármilyen kromoszóma aberráció (ChA) és izoláltan a del17p jelenléte esetén.

V. MEGBESZÉLÉS

Nagyszámú irodalmi adat támasztja alá, hogy CLL/SLL-ben a PF-ok kiemelt szerepet játszanak a sejtproliferációban és a betegség progressziójában. A molekuláris eltérések is – beleértve a citogenetikai eltéréseket és az aberráns onkoprotein expressziót – jellemzően a PF-ok területén akkumulálódnak. Gibson és mtsai. pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL-es nyirokcsomókból származó mintákban immunhisztokémiai vizsgálatok során azt találták, hogy az esetek 89%-ában a c-Myc protein expressziója 5 %-ot meghaladó (64%-ban 25%-ot meghaladó) a PF területeken, ezzel szemben az IF terekben az esetek többségében az expresszió 5% alatti. A *c-Myc* gén átrendeződése az esetek 82%-ában nem volt igazolható, amely alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a c-Myc overexpressziójának háttérében egyéb szabályozó molekulák hatása állhat [50]. Giné és munkatársainak vizsgálataiban a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL-es betegek nyirokcsomóiban a proliferációs ráta Ki-67 immunhisztokémiai vizsgálattal a PF-ok területén 10% felettinél bizonyult, míg a PF és IF területeket együttesen vizsgálva ez a ráta 2 %-nál kevesebbre tehető [49]. Ciccone munkacsoportja azt találta, hogy a pszeudofollikulusokban gazdag CLL/SLL-es betegek mintáiban gyakoribb a 17p deléció, az *IgHV* gén átrendeződése, és a 12-es kromoszóma triszómiája, valamint ezen esetekben a proliferációs ráta Ki-67-tel 30% feletti. Vizsgálataikban a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es betegek túlélése jóval rövidebb volt (11 hónap, a szövettanilag típusos megjelenésű CLL/SLL-es betegek 64 hónapos túlélésével szemben) [43]. Balogh és mtsai. vizsgálataikban kimutatták, hogy a 11q deléció, 13q deléció és 17p deléció a PF-ok tumorsejtjeiben szignifikánsan nagyobb számban fordul elő, mint az IF terek tumorsejtjeiben [53]. Más tanulmányban a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es nyirokcsomókból a PF-ok sejtjeiben ciklin-D1 fehérje expressziót detektáltak immunhisztokémia vizsgálattal [52]. A ciklin D2 fehérje overexpresszióját a PF-okban szintén kimutatták. Igawa és mtsai a fokozott ciklin D2 expresszió okának felderítése céljából végzett vizsgálataik alapján azt találták, hogy az NFκB expresszió is fokozott és utóbbiról ismert, hogy direkt indukálja a ciklin D2-t a *CCND2* gén promotor régiójához kötődve. Eredményeik alapján feltételezhető az is, hogy a c-Myc indirekt módon, a p27 downregulációja révén szintén részt vesz a folyamatban [51].

Összességében az irodalmi adatok alapján a pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL klinikailag agresszívebb viselkedést mutat [1, 49, 201] és a PF-ok szerepét a

proliferációban jól mutatja, hogy sejtjeiben a Ki-67, CD23, CD71, MUM1/IRF-4, valamint a cyclin-D1 és D2 fehérjék expressziója magasabb az IF terekhez képest [41, 52, 202-204].

A mikroRNS-ek megváltozott expresszióját CLL/SLL-ben szintén több tanulmány igazolta, és számos irodalmi adat szól amellett, hogy a mikroRNS-ek szerepet játszanak a betegség patogenezisében [112]. Nemrégiben leírták a PF-ban a sejtciklusba való belépést, valamint a sejt növekedést szabályozó mikroRNS-ek eltérő expresszióját is. RNS in situ hibridizációs módszerrel Wang és mtsai. 8 pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL-es beteg nyirokcsomójából származó mintáján igazolták, hogy a magasabb miR-155 és alacsonyabb miR-150 expressziót mutató tumorsejtek a PF-okban lokalizálódnak [110].

Tanulmányaink elsődleges célja az volt, hogy tovább karakterizáljuk a CLL/SLL pszeudofolikulusait és ezzel hozzájáruljunk a betegség pontosabb megismeréséhez. Kíváncsiak voltunk, hogy a CLL prognózisát negatívan befolyásoló faktorok közül bizonyos mikroRNS-ek és az EZH2 expressziója eltér-e a PF-okban a környező IF terekhez képest.

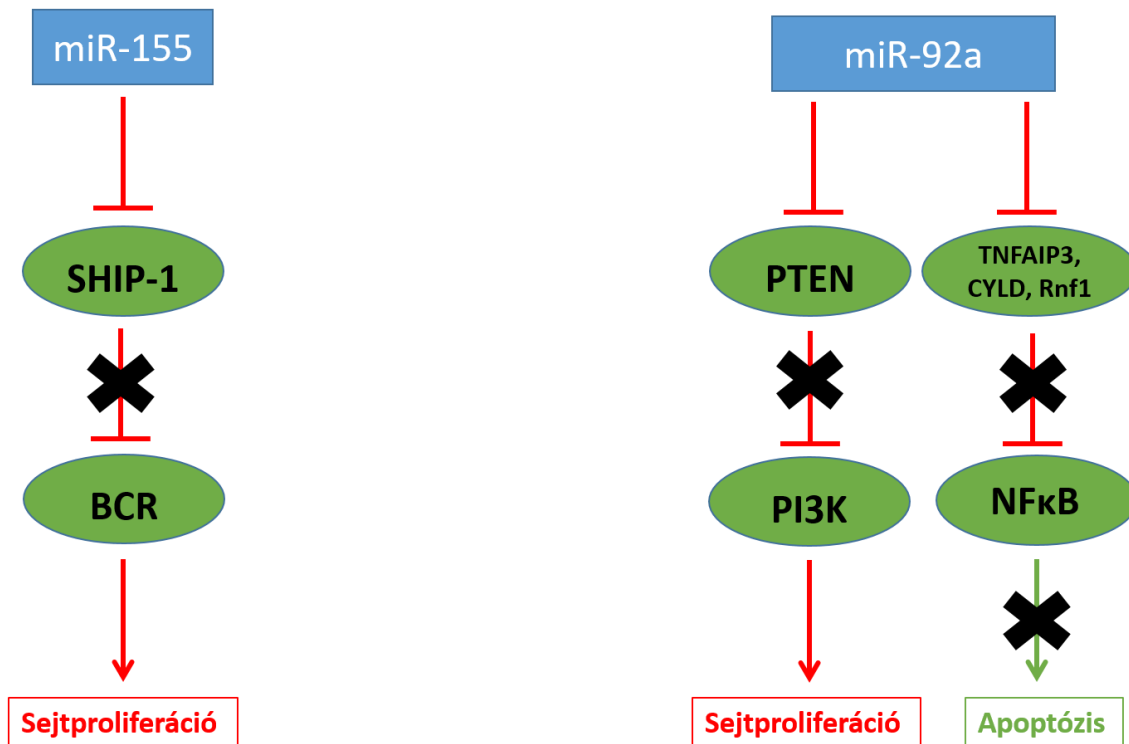
A mikroRNS expresszió vizsgálatához 15 pszeudofolikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es beteg nyirokcsomójának PF és IF tereiben hasonlítottuk össze 19 mikroRNS expresszióját valós idejű PCR reakcióval. A PF és IF tereket lézermikrodisszekcióval különítettük el. A vizsgált 19 mikroRNS közül a miR-155 és a miR-92a szignifikánsan magasabb, míg a miR-150 és miR-26a szignifikánsan alacsonyabb expresszióját igazoltuk a PF-ok területén. Eredményeink egy része megerősíti Wang és mtsai. eredményeit [110], továbbá alátámasztja azt a nézetet, miszerint a PF-ok sejtjei eltérő tulajdonságúak az IF terek sejtjeihez képest.

A miR-155 magasabb expressziója különböző magas malignitású hematológiai betegségekben már ismert [111]. Feltételezhető, hogy a miR-155 proto-onkogén szerepet tölt be és a target gének (pl. *SOCS1* és *SHIP-1*) expressziójának szabályozásával elsősorban a fokozott sejtproliferáció és sejttúlélés irányába hat [112, 113]. A miR-155 a B-sejt receptoron keresztül (BCR) is serkenti a sejtproliferációt nem csak a B-sejtek aktiválása során, hanem a B-sejtes lymphomák egy részében is [114, 115]. A PF-okban igazolt magasabb miR-155 expresszió felveti a lehetőségét annak, hogy a miR-155 megzavarja a PF-okban a BCR szignálutat, és ezen keresztül vesz részt a CLL/SLL progressziójában.

Vizsgálatainkban egy másik fontos oncomiR, a miR-17-92a cluster tagjaként ismert miR-92a is szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a PF-ok területén. A c-Myc-mediált transzkripció révén a miR-17-92a cluster család tagjainak magasabb expressziója gyakran megfigyelhető lymphomákban [120]. Kísérlet igazolja, hogy B-sejt specifikus miR-17-92a transzgén egerekben cMyc-mediált lymphoma fejlődik ki [121]; Gibson és mtsai. pedig leírták, hogy a CLL/SLL PF-aiban a c-Myc fehérje expressziója magasabb [50]. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a c-Myc overexpressziója állhat az emelkedett miR-92a expresszió hátterében. Ismert az is, hogy a miR-17-92a család legfontosabb célfehérjéi a PTEN [205] és a TGF-béta [206]. A PTEN-ről ismert, hogy CLL-ben alacsonyabb expressziót mutat [207]. Elképzelhető, hogy a pszeudofollikulusokban detektált magasabb miR-92a expresszió a PTEN downregulációján keresztül elősegíti a fokozott sejtnövekedést a foszfatidil inozitol 3 kináz (PI3K) út gátlásának kiesése révén. Irodalmi adatok alapján a miR-92a expressziója hatással van pl. az NFκB-re. DLBCL egy csoportjában kimutatták, hogy a miR-92a fokozott expressziója révén csökken az NFκB-t negatívan szabályozó TNFAIP3, CYLD és Rnfl termelés, ezáltal a fokozott NFκB termelés következtében apoptózis gátlás az eredmény [121, 208]. A miR-ek fokozott expressziója terápiás szempontból fontos, ugyanis a miR-ek gátlásán alapuló szerek közül már számos elérhető preklinikai fázisban, többek között az antagomiR-155 [95].

A 21. ábra szemlélteti a miR-155 és a miR-92a szabályozó szerepét a sejtproliferációban és az apoptózisban.

Eredményeink alapján a miR-150 expressziója a PF-okban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A miR-150 tumorszuppresszor funkciója ismert és csökkent expresszióját kimutatták már a legtöbb humán leukémiában, többek között a krónikus és az akut myeloid leukémiában is [116]. Feltételezések szerint az alacsonyabb miR-150 expresszió a BCR szignálút csökkent gátlásához vezet, melynek fokozott sejtproliferáció a következménye [117]. A miR-150 egy másik célfehérjéje a FOXP1, melynek – részben a miR-150 csökkent expresszióján keresztül megvalósuló – fokozott expresszióját leírták CLL-ben és a fokozott expressziót rosszabb prognózissal hozzák összefüggésbe [117]. Ismert, hogy CLL-ben a tumorsejtek általánosan magas miR-150 expressziót mutatnak, és a magas miR-150 expresszió összefüggésbe hozható a betegek hosszabb túlélésével [209]. Ezzel ellentétben, alacsonyabb miR-150 expressziónál a betegek túlélése is rosszabb.



21. ábra. A miR-155 és miR-92a lehetséges szabályozó szerepe a sejtproliferációban és az apoptózisban. Az emelkedett miR-155 expresszió révén a SHIP-1 gátló hatása csökken, ezáltal a BCR útvonalon keresztül a sejtproliferáció mértéke nő. A miR-92a fokozott expressziója következtében a PTEN kevésbé gátolja a PI3K-t, mely szintén a sejtproliferáció irányába hat. Emellett az NFκB alacsonyabb expressziója révén a az apoptózis mértéke is csökken.

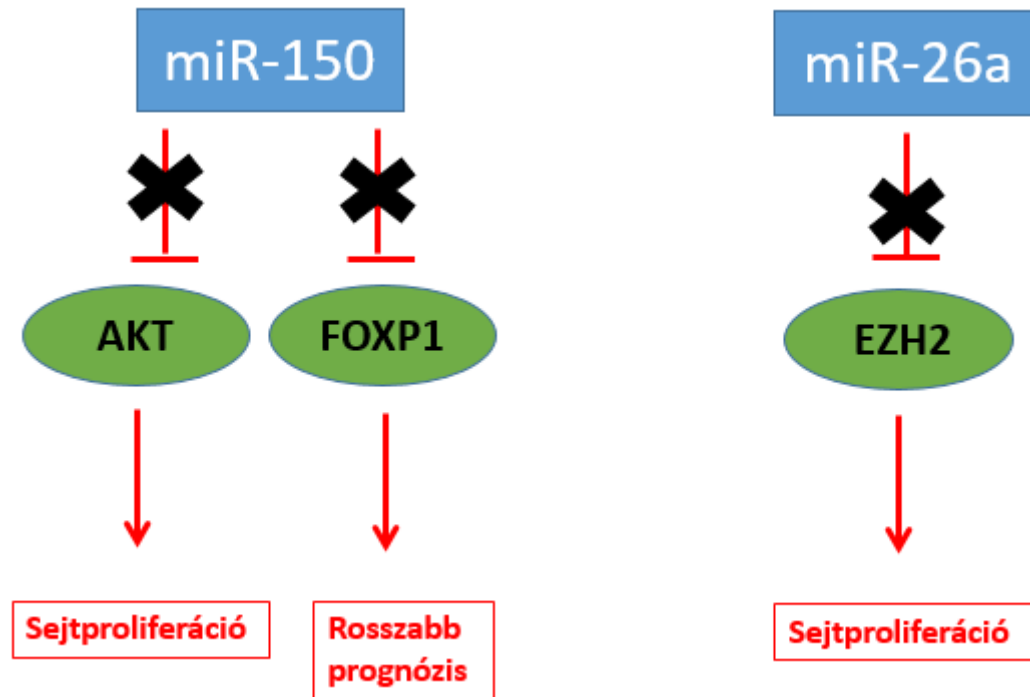
A korábban említett *in situ* hibridizációs vizsgálattal kimutatták, hogy a pszeudofollikulusokban kevesebb a miR-150 pozitivitást mutató sejt [110], amelyet a mi eredményünk is alátámaszt. Watanabe miR-150 transzfektált lymphoma sejtvonalakon végzett tanulmányai alapján a miR-150 direkt gátolja a DKC1-et és az AKT2-t, emellett csökkenti a foszforilált AKT mennyiségét. A miR-150 direkt kötődik az AKT2 és a DKC1 3'UTR régiójához. Az AKT foszforilációja révén aktiválódik a PI3K-AKT útvonal. A PI3K-AKT útvonal folyamatos aktivációja a proliferáció irányába tolja el a folyamatokat. A pAKT a telomeráz aktivitáson keresztül vezet a daganatsejtek immortalizációjához [210]. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a proliferációs centrumok alacsonyabb miR-150 expressziója, pl. az AKT jelátviteli út [117] gátlásának csökkenésén keresztül, hozzájárul a CLL progressziójához. Összességében a csökkent miR-150 termelés kapcsolatba hozható a tumorsejtek

megnövekedett proliferációs aktivitásával, mely megerősíti a feltételezést, miszerint a PF-ok kiemelt szerepet játszanak a betegség progressziójában.

A miR-26a expressziója szintén szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a PF-okban. A miR-26a egyik ismert szerepe, hogy – számos fehérje mellett – gátolja az EZH2 expresszióját. Sander és mtsai lymphoma sejtvonalakon vizsgálták a miR-26a lehetséges célgénjeit. MiR-26a szekvenciát tartalmazó vektorral klónozott B-sejtes lymphoma sejtvonalakat hasonlítottak össze üres vektorral transzfektált sejtvonalakkal. Vizsgálatuk eredményei szerint az EZH2 a miR-26a targetje, lymphoma sejtvonalakon a miR-26a expresszió alacsony, míg az EZH2 termelés fokozott. Azóta több tanulmány igazolta, hogy az EZH2 3'UTR régiójához direkt kötődik a miR-26a. Szintén tanulmányokból ismert, hogy a miR-26a direkt gátolja a ciklin D2 és E2 expressziót, és a miR-26a egyik bizonyított negatív szabályozója pedig a Myc [123, 173, 211]. Az alacsonyabb miR-26a szint tehát fokozott EZH2 termeléshez vezet, mely szintén a sejtproliferációt segíti elő. A 22. ábra szemlélteti a miR-150 és a miR-26a szabályozó szerepét a sejtproliferációban.

A mikroRNS-ek megváltozott expressziójának tehát feltehetőleg szerepe van a CLL/SLL progressziójában, így a terápiás konzekvencia mellett a betegség várható progressziójának előzetes jelzésére is alkalmas lehet. Amennyiben a betegeknek leukémiás vérképe is van, úgy folyadék alapú citológiára alapozott új generációs szekvenáló eljárás alkalmas lehet annak felderítésére, hogy az esetlegesen PF-okból származó, megváltozott miR expressziójú sejtek a perifériás vérben kimutathatóak-e és ha igen, milyen számban. Ezirányú vizsgálatok az irodalmi adatok alapján és jelenlegi tudásunk szerint nem ismertek.

Jelen munkánkban az EZH2 expresszióját immunhisztokémiai vizsgálatokkal tanulmányoztuk 15 CLL/SLL-es nyirokcsomóban, és a digitális kvantitatív kiértékelés segítségével szignifikánsan magasabb expressziót igazoltunk a PF-ok területén az IF területekhez képest. Ez az eredmény párhuzamban áll van Kemenade és mtsai. vizsgálatainak eredményével, miszerint a magasabb EZH2 expressziót mutató sejtek nagyméretű, Ki-67 pozitív tumorsejtek, amelyekről ismert, hogy többségükben a PF-okra lokalizálódnak [148].



22. ábra. A miR-150 és miR-26a szabályozó szerepe a sejtproliferációban. A miR-150 alacsonyabb expressziója az AKT jelátviteli úton keresztül a fokozott proliferáció irányába hat, illetve a FOXP1-et gátló hatásának csökkenése révén a betegség rosszabb prognózisával jár együtt. A miR-26a csökkent expressziója a fokozott EZH2 expresszió keresztül szintén serkenti a sejtproliferációt.

Számos kutatási eredmény alapján feltételezhető, hogy CLL/SLL-ben a fokozott EZH2 expresszió rosszabb prognózissal társul, ugyanakkor a CLL/SLL patomechanizmusában az EZH2 szerepe pontosan még nem tisztázott [124, 169, 170]. Eredményünk, miszerint az EZH2 expresszió elsősorban a PF-ok sejtjeire lokalizálódik, megerősíti azt a hipotézist, hogy a CLL progressziójában a PF-oknak kiemelt szerepük van.

Visszatérő *EZH2* mutáció a CLL-ben nem ismert [212] [213, 214], ugyanakkor szeretnénk volna biztosan kizárni, hogy esetleg aktiváló mutáció áll-e az EZH2 overexpresszió hátterében. A 15 CLL/SLL mintából 14 mintán tudtuk elvégezni az *EZH2* 16-os és 18-as exonjának szekvencia analízisét, mely során mutációt nem azonosítottunk.

További célunk volt annak felderítése, hogy a fentebb leírt miR-26a mellett még milyen más szabályozók eltérései állhatnak a PF-ban megfigyelhető megnövekedett EZH2 expresszió hátterében.

A CLL/SLL PF-aiban ismert a c-Myc overexpressziója [50]. A c-Myc az EZH2 expresszióját gátló miR-26a szabályozásán keresztül áll közvetett viszonyban az EZH2-

vel, és emellett a c-Myc az E2F1 transzkripció faktorát is aktiválja [173, 174]. Az E2F1 serkentően hat az EZH2-re [153]. Az E2F1-et a tumorszuppresszor Rb is szabályozza, oly módon, hogy az Rb foszforiláció révén inaktiválódik, ezáltal a gátlás kiesése révén nő az E2F1 termelés [175, 176]. Fenti irodalmi adatok alapján immunhisztokémiával vizsgáltuk a c-Myc, az E2F1 és a pRb expresszióját a 15 CLL/SLL-es nyirokcsomó mintán. A digitális kvantitatív kiértékelés segítségével mindhárom fehérje expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a PF-ok területén az IF terekhez képest.

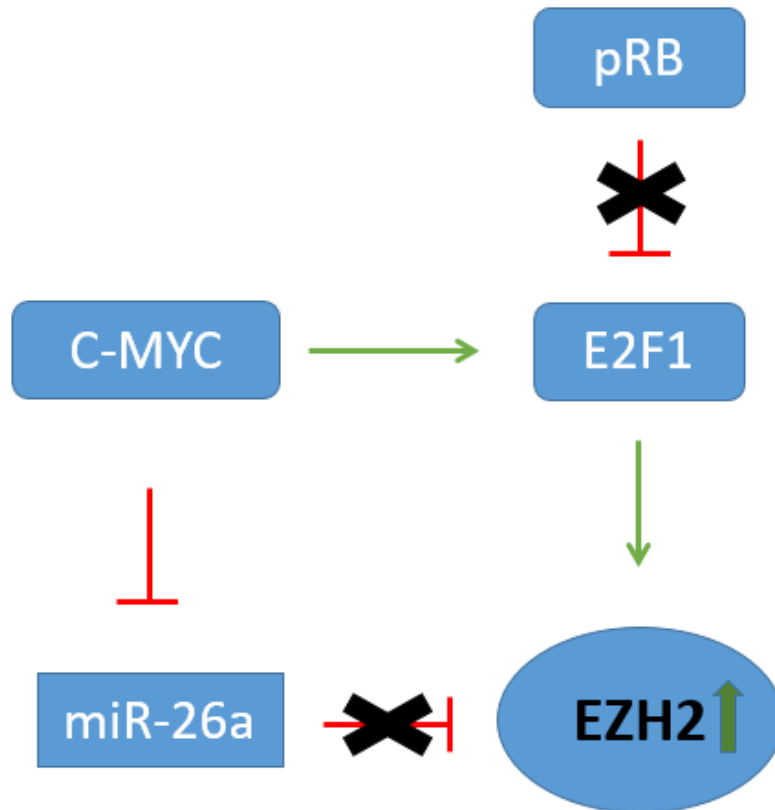
Ezen eredmények a miR-26a fokozott expressziójával együtt felvetik a lehetőségét annak, hogy a c-Myc/E2F1, c-Myc/miR-26a és pRb/E2F1 utak a felelősek a PF-ok területén megfigyelt fokozott EZH2 expresszióért.

Az EZH2 expresszió szabályozására számos eltérő módon ható szer áll rendelkezésre. Közülük lymphomákban leginkább tanulmányozott a pán-metiltranszferáz gátló (3-deazaneplanocin A, DZNep), melynek hatását számos agresszív lefolyású lymphomában tanulmányozták, pl. köpenysejtes lymphomában, Burkitt lymphomában vagy DLBCL-ben [215], azonban CLL/SLL kapcsán hasonló vizsgálati eredmények még nem állnak rendelkezésre.

A normál nyirokcsomó centrum germinatívumaira is jellemző az EZH2, E2F1, c-Myc és pRb megnövekedett expressziója. A normál nyirokcsomóban a c-Myc fehérje fontos szerepet játszik a centrum germinatívum kialakulásában, azonban expressziója a CG kialakulása után lecsökken. A normál B-sejtek proliferációjához, ill. a sejtek metabolikus aktivitásához c-Myc nem szükséges. Más munkacsoportok azt találták, hogy a CG-on belül Myc-pozitív szubpopuláció kimutatható, mely magasabb kockázatot jelenthet malignus transzformáció kialakulására. Magas malignitású érett B-sejtes lymphomákban sokszor van jelen a Myc gén transzlokációja, de sokszor Myc-transzlokáció hiányában is fokozott a Myc expressziója. Az E2F1 mRNS és fehérje expresszió is magas a CG B-sejtjeiben. Az E2F1 mellett az EZH2 és pRB magasabb expressziója is kimutatható. A CG sejteiben a pRB-E2F1 útvonalon keresztül fokozott az EZH2 termelés. Ez a szabályozó kör ismert DLBCL-ben is. Tanulmányaink alapján a szabályozó körbe a c-Myc/miR-26a útvonal is beleszól. Míg CLL-ben a PF-ok területén atípusos sejtek találhatóak, az egészséges nyirokcsomó centrum germinatívumában normál B-sejtek vannak. Ettől függetlenül jogosan merül fel a feltételezés, hogy a normál CG-ban elszórtan jelen lévő Myc pozitív sejtek nagyobb

eséllyel transzformálódnak malignusan [175, 216-219]. CLL-ben ez a folyamat még nem tisztázott.

CLL-ben az EZH2-t szabályozó utakat a 23. ábra szemlélteti.



23. ábra. Az EZH2-t szabályozó utak. A c-Myc fokozott expressziója révén egyrészt csökken a miR-26a expresszió, másrészt nő az E2F1 expresszió. Utóbbi expresszióját az RB – foszforiláció révén létrejövő – gátló hatásának kiesése is fokozza. Az alacsony miR-26a és magas E2F1 expresszió következtében nő az EZH2 expressziója.

Tanulmányainkban megvizsgáltuk a miRNS, EZH2, c-Myc, E2F1 és pRb expresszió és az *IgHV* gén mutációs státusza, valamint a CLL/SLL-ben prognosztikai jelentőséggel bíró kromoszóma aberrációk lehetséges kapcsolatát is. Bár a vizsgálat elemszáma kevés, statisztikailag szignifikánsan alacsonyabb miR-150 expressziót mértünk mind a PF, mind az IF területén azokban az esetekben, amelyekben az *IgHV* gén nem volt mutált. Régóta ismert, hogy CLL-ben rosszabb prognózisra utal, ha az *IgHV* génben mutációt nem nincs jelen [14, 220, 221]. Több kutatócsoport felvetette már a lehetőségét annak, hogy a csökkent miR-150 expresszió kapcsolatban áll az *IgHV* gén nem mutált státuszával [117, 119, 196], ugyanakkor a két eltérés kapcsolata még nem teljesen tisztázott.

Rabello és mtsai. vizsgálataik során emelkedett EZH2 expressziót találtak azokban a CLL-es betegekben, akik valamilyen visszatérő kromoszóma eltérést hordoztak. Mi hasonló szignifikáns összefüggést nem találtunk, ugyanakkor a 11q delécióval járó esetekben a miR-150 expressziója az IF területén szignifikánsabb alacsonyabb volt. A rosszabb prognózissal társuló kromoszóma aberrációt hordozó esetekben a PF-ok területén a mir-26a expressziója is alacsonyabbnak bizonyult a kromoszóma eltérést nem mutató esetekhez képest.

Vizsgálatunk érdekes eredménye, hogy 17p deléció esetén a PF-okban szintén alacsonyabb volt a miR-26a expressziója a 17p deléciót nem hordozó esetekhez képest. 17p deléció esetén a *TP53* gén deletált és ezen deléciót hordozó betegek kemoterápia rezisztensek. Az igazolt del17p-vel járó esetek >80%-ában a másik *TP53* allél mutációja igazolható [2]. Del17p hiányában *TP53* mutáció ritkábban fordul elő. A *TP53* mutációja igen rossz prognózissal társul [22]. A legújabb vizsgálatok alapján – terápiás szempontból – a CLL/SLL egyik legfontosabb prognosztikai tényezője a *TP53* mutációs státusz. 17p deléció és/vagy *TP53* mutáció jelenléte esetén, ha a betegség aktív és a beteg jó állapotú elsővonalbeli kezelésként a BTK gátló Ibrutinib vagy a PI3K gátló Idelalisib a választandó szerek [2]. A PI3K fokozott aktivitásáért felelős upstream mediátorok - pl. miR-92a, melynek fokozott expressziója következtében csökken a PTEN PI3K-t gátló hatása - terápiás befolyásolására egyelőre nincs mód. A miR-26a–17p deléció lehetséges kapcsolatára irányuló vizsgálat pedig az irodalmból eddig nem ismert.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- Az oncomiR-ek közül a miR-155 és a miR-92a fokozott expressziója, a tumorsuppresszor miR-ek közül a miR-150 és a miR-26a csökkent expressziója igazolható a pszeudofollikulusok területén az IF területekhez képest CLL/SLL-es betegek nyirokcsomóiban.
- EZH2 overexpresszió igazolható a CLL/SLL-es betegek nyirokcsomóinak PF területein az IF területekhez képest, melynek hátterében feltehetően a c-Myc/E2F1, c-Myc/miR-26a és pRb/E2F1 szabályozó útvonalak megváltozott működése áll.
- Az EZH2 overexpresszió hátterében *EZH2* gén aktiváló mutáció nem igazolható a CLL/SLL-es esetekben.
- Összefüggés lehet a rosszabb prognózissal járó kromoszóma aberrációt hordozó betegek, ill. a szintén rosszabb prognózisú NM *IgHV* gén státuszú betegek és a miR-26a csökkent, illetve az EZH2 fokozott expressziója között.
- Összességében eredményeink alátámasztják, hogy a CLL/SLL PF-ai különleges biológiai sajátosságokkal rendelkeznek, és a betegség progressziójában szerepet játszó molekuláris eltérések elsősorban a PF-ok sejtjeiben jelennek meg.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

Nyirokcsomóban a krónikus lymphocytás leukemia/kis lymphocytás lymphoma (CLL/SLL) sajátossága a neoplasztikus kis lymphoid sejtek diffúz infiltrációja mellett a prolymphocytákat és paraimmunoblasztokat tartalmazó pszeudofollikulusok (PF) jelenléte. Számos vizsgálat igazolja, hogy a különféle molekuláris eltérések a PF-ek tumorsejtjeiben halmozódnak fel, mely alapján feltételezhető, hogy a PF-ek kiemelt szerepet játszanak a sejtproliferációban és a betegség progressziójában. Ismert továbbá, hogy a kiterjedt pszeudofollikuláris mintázatot mutató esetek lefolyása kedvezőtlenebb.

A PF-ek szerepének további vizsgálatára 15 pszeudofollikuláris mintázatot mutató CLL/SLL-es beteg nyirokcsomó mintáiban vizsgáltuk 19 – a CLL kialakulásában és progressziójában szerepet játszó – mikroRNS, illetve az *EZH2* expresszióját a PF területeken az interfollikuláris (IF) területek expressziójával összehasonlítva. Az *EZH2*-t szabályozó *c-Myc*, *E2F1* és *pRb* expresszióját is vizsgáltuk, illetve az *EZH2* mutáció analízisét is elvégeztük. A kapott eredményeket összevetettük a FISH vizsgálat során talált kromoszóma eltérésekkel, valamint a betegek *IgHV* státuszával.

Eredményeink alapján az oncomiR *miR-155* és *miR-92a* expressziója a PF-okban fokozott, míg a tumorsuppresszor *miR-150*, valamint az *EZH2*-t gátló *miR-26a* expressziója alacsonyabb az IF területekhez viszonyítva. Az alacsony *miR-150* expresszió összefüggést mutat a 11q deléciójával. Az *EZH2* expressziója szintén fokozott a PF-okban. Aktiváló *EZH2* mutációt nem azonosítottunk, azonban az *EZH2*-t szabályozó *c-Myc*, *E2F1* és *pRb* szintén fokozottan expresszáldott.

Összeségében vizsgálatainkkal oncomiR-ek magasabb és tumorsuppresszor-miR-ek alacsonyabb expresszióját, illetve az *EZH2* és az őt szabályozó fehérjék fokozott termelését igazoltuk CLL/SLL PF-aiban, mely újabb bizonyítékkal szolgál arra, hogy a PF-ok eltérő biológiai sajátosságokkal rendelkeznek az IF terekhez képest. Eredményeink alátámasztják azt a hipotézist is, miszerint a CLL/SLL progressziójában szerepet játszó biológiai folyamatok elsősorban a PF-ok területén zajlanak le.

VIII. SUMMARY

Beside the diffuse infiltration of small neoplastic lymphocytes, proliferation centres (PCs) comprising prolymphocytes and paraimmunoblasts are histological hallmarks of lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL). Several studies have confirmed, that various molecular alterations accumulate in the tumor cells of PCs, supporting that PCs may have an important role in cell proliferation and progression of the disease. It is also well known that extended PCs are related to a less favourable prognosis.

To further characterize the pathogenic role of PCs, the expression levels of 19 selected miRs known to be involved in the development of CLL/SLL were compared in the PCs and the intervening small cell areas in lymph nodes of 15 patients with CLL/SLL. We also examined the expression level of EZH2 protein, the overexpression of which has recently been recognized as poor prognostic factor in CLL/SLL and its mutational profile, as well as the expression of its upstream regulators c-Myc, E2F1 and pRb. The results were also compared to the cytogenetic alterations defined by FISH analysis and to the *IgHV* mutational status.

Two known oncomiRs, miR-155 and -92a were upregulated, the tumor suppressor miR-150 and miR-26a, inhibitor of EZH2 were downregulated in the PCs. Low expression of miR-150 was also associated with loss of 11q. Our results showed a significantly increased expression of EZH2 in the PCs. No EZH2 activating mutations were detected, however, overexpression of c-Myc, E2F1 and pRb proteins were confirmed.

In summary, higher expression of oncomiRs, lower expression of tumor suppressor miRs and the upregulation of EZH2 and its regulator proteins in PCs of CLL/SLL lymph nodes provide further evidence for the distinguished biological features of the PCs, and also support the hypothesis that pathogenic processes proved to be involved in a more aggressive CLL/SLL take place predominantly in the PCs.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. C.E. Swerdlow SH, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. 2018 *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. WHO Classification of Tumours, Revised 4th Edition, Volume 2, ed. IARC
2. Hallek, M., 2017 *Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. Am J Hematol. **92**(9): p. 946-965. doi: 10.1002/ajh.24826.
3. Mucsi, O., 2016 *Treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia*]. Magy Onkol. **60**(2): p. 127-136. Epub 2016 Mar 23.
4. Swerdlow, S.H., E. Campo, S.A. Pileri, N.L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G.A. Salles, A.D. Zelenetz, and E.S. Jaffe, 2016 *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood. **127**(20): p. 2375-2390. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569. Epub 2016 Mar 15.
5. Morton, L.M., S.S. Wang, S.S. Devesa, P. Hartge, D.D. Weisenburger, and M.S. Linet, 2006 *Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001*. Blood. **107**(1): p. 265-276. Epub 2005 Sep 8.
6. Herold, G., 2004 *Belgyógyászat*.
7. Abbott, B.L., 2006 *Chronic lymphocytic leukemia: recent advances in diagnosis and treatment*. Oncologist. **11**(1): p. 21-30. doi: 10.1634/theoncologist.11-1-21.
8. Wadhwa, P.D. and V.A. Morrison, 2006 *Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol. **33**(2): p. 240-249.
9. Hamblin, T.J., 2006 *Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol. **33**(2): p. 230-239.
10. Matolcsy A, U.M., Kopper L., 2006 *Hematológiai betegségek atlasza*. Medicina Könyvkiadó Rt.: Budapest: p. 10.1 fejezet, 222-231
11. Tsimberidou, A.M. and M.J. Keating, 2005 *Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies*. Cancer. **103**(2): p. 216-228.
12. Morabito, F., L. Mosca, G. Cutrona, L. Agnelli, G. Tuana, M. Ferracin, B. Zagatti, M. Lionetti, S. Fabris, F. Maura, S. Matis, M. Gentile, E. Vigna, M. Colombo, C. Massucco, A.G. Recchia, S. Bossio, L. De Stefano, F. Ilariucci, C. Musolino, S. Molica, F. Di Raimondo, A. Cortelezzi, P. Tassone, M. Negrini, S. Monti, D. Rossi, G. Gaidano, M. Ferrarini, and A. Neri, 2013 *Clinical*

- monoclonal B lymphocytosis versus Rai 0 chronic lymphocytic leukemia: A comparison of cellular, cytogenetic, molecular, and clinical features.* Clin Cancer Res. **19**(21): p. 5890-5900. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0622. Epub 2013 Sep 13.
13. Strati, P. and T.D. Shanafelt, 2015 *Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification.* Blood. **126**(4): p. 454-462. doi: 10.1182/blood-2015-02-585059. Epub 2015 Jun 11.
 14. Damle, R.N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S.L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S.M. Lichtman, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, K.R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, 1999 *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.* Blood. **94**(6): p. 1840-1847.
 15. Vollbrecht, C., F.D. Mairinger, U. Koitzsch, M. Peifer, K. Koenig, L.C. Heukamp, G. Crispatzu, L. Wilden, K.A. Kreuzer, M. Hallek, M. Odenthal, C.D. Herling, and R. Buettner, 2015 *Comprehensive Analysis of Disease-Related Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia by Multiplex PCR-Based Next Generation Sequencing.* PLoS One. **10**(6): p. e0129544. doi: 10.1371/journal.pone.0129544. eCollection 2015.
 16. Amin, N.A. and S.N. Malek, 2016 *Gene mutations in chronic lymphocytic leukemia.* Semin Oncol. **43**(2): p. 215-221. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.002. Epub 2016 Feb 6.
 17. Jame Abraham, J.L.G., Carmen J. Allegra, 2010 *The Bethesda Handbook of Clinical Oncology* Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: p. Chapter 24 Chronic lymphoid leukemias 3rd Edition.
 18. K. R. Rai, M.a.M.J.K.B., 2003 *Holland-Frei cancer medicine.* Decker Inc. NCBI Bookshelf p. Chapter 130. Chronic Lymphocytic Leukemia , alfejezet: Clinical Staging and Other Prognostic Features.
 19. Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, and P. Lichter, 2000 *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med. **343**(26): p. 1910-1916.
 20. Orchard, J.A., R.E. Ibbotson, Z. Davis, A. Wiestner, A. Rosenwald, P.W. Thomas, T.J. Hamblin, L.M. Staudt, and D.G. Oscier, 2004 *ZAP-70 expression*

- and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet. **363**(9403): p. 105-111.
21. Falay, M., F. Ceran, A.K. Gunes, S. Dagdas, M. Ayli, and G. Ozet, 2016 *CD38 Expression and Variation as a Prognostic Factor Chronic Lymphocytic Leukemia*. Clin Lab. **62**(7): p. 1287-1293. doi: 10.7754/Clin.Lab.2015.151125.
 22. Zenz, T., D. Vollmer, M. Trbusek, J. Smardova, A. Benner, T. Soussi, H. Helfrich, M. Heuberger, P. Hoth, M. Fuge, T. Denzel, S. Habe, J. Malcikova, P. Kuglik, S. Truong, N. Patten, L. Wu, D. Oscier, R. Ibbotson, A. Gardiner, I. Tracy, K. Lin, A. Pettitt, S. Pospisilova, J. Mayer, M. Hallek, H. Dohner, and S. Stilgenbauer, 2010 *TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations*. Leukemia. **24**(12): p. 2072-2079. doi: 10.1038/leu.2010.208. Epub 2010 Sep 23.
 23. Landau, D.A., E. Tausch, A.N. Taylor-Weiner, C. Stewart, J.G. Reiter, J. Bahlo, S. Kluth, I. Bozic, M. Lawrence, S. Bottcher, S.L. Carter, K. Cibulskis, D. Mertens, C.L. Sougnez, M. Rosenberg, J.M. Hess, J. Edelmann, S. Kless, M. Kneba, M. Ritgen, A. Fink, K. Fischer, S. Gabriel, E.S. Lander, M.A. Nowak, H. Dohner, M. Hallek, D. Neuberg, G. Getz, S. Stilgenbauer, and C.J. Wu, 2015 *Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse*. Nature. **526**(7574): p. 525-530. doi: 10.1038/nature15395. Epub 2015 Oct 14.
 24. 2016 *An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data*. Lancet Oncol. **17**(6): p. 779-790. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30029-8. Epub 2016 May 13.
 25. Robertson, L.E., W. Pugh, S. O'Brien, H. Kantarjian, C. Hirsch-Ginsberg, A. Cork, P. McLaughlin, F. Cabanillas, and M.J. Keating, 1993 *Richter's syndrome: a report on 39 patients*. J Clin Oncol. **11**(10): p. 1985-1989.
 26. Dolcetti, R. and A. Carbone, 2010 *Epstein-Barr virus infection and chronic lymphocytic leukemia: a possible progression factor?* Infect Agent Cancer. **5**:22.(doi): p. 10.1186/1750-9378-5-22.
 27. Dighiero, G., K. Maloum, B. Desablens, B. Cazin, M. Navarro, R. Leblay, M. Leporrier, J. Jaubert, G. Lepeu, B. Dreyfus, J.L. Binet, and P. Travade, 1998 *Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia*. N Engl J Med. **338**(21): p. 1506-1514.

28. Shustik, C., R. Mick, R. Silver, A. Sawitsky, K. Rai, and L. Shapiro, 1988 *Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation*. Hematol Oncol. **6**(1): p. 7-12.
29. Spanish Cooperative Group, P., 1991 *Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Preliminary Report of Spanish (Pethema) Trials*. Leuk Lymphoma. **5**(Suppl 1): p. 89-91. doi: 10.3109/10428199109103385.
30. Hallek, M., B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M.J. Keating, E. Montserrat, K.R. Rai, and T.J. Kipps, 2008 *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines*. Blood. **111**(12): p. 5446-5456. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906. Epub 2008 Jan 23.
31. Rosenwald, A., A.A. Alizadeh, G. Widhopf, R. Simon, R.E. Davis, X. Yu, L. Yang, O.K. Pickeral, L.Z. Rassenti, J. Powell, D. Botstein, J.C. Byrd, M.R. Grever, B.D. Cheson, N. Chiorazzi, W.H. Wilson, T.J. Kipps, P.O. Brown, and L.M. Staudt, 2001 *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med. **194**(11): p. 1639-1647.
32. Fais, F., F. Ghiotto, S. Hashimoto, B. Sellars, A. Valetto, S.L. Allen, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, K. Rai, L.Z. Rassenti, T.J. Kipps, G. Dighiero, H.W. Schroeder, Jr., M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, 1998 *Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors*. J Clin Invest. **102**(8): p. 1515-1525.
33. Klein, U., Y. Tu, G.A. Stolovitzky, M. Mattioli, G. Cattoretti, H. Husson, A. Freedman, G. Inghirami, L. Cro, L. Baldini, A. Neri, A. Califano, and R. Dalla-Favera, 2001 *Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells*. J Exp Med. **194**(11): p. 1625-1638.
34. Schroeder, H.W., Jr. and G. Dighiero, 1994 *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire*. Immunol Today. **15**(6): p. 288-294.
35. Kipps, T.J., E. Tomhave, L.F. Pratt, S. Duffy, P.P. Chen, and D.A. Carson, 1989 *Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene*

- expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A. **86**(15): p. 5913-5917.
36. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, 2011 *Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities.* Blood. **117**(6): p. 1781-1791. doi: 10.1182/blood-2010-07-155663. Epub 2010 Dec 9.
 37. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, 2003 *B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor.* Annu Rev Immunol. **21**: p. 841-894. Epub 2001 Dec 19.
 38. Caligaris-Cappio, F., M. Riva, L. Tesio, M. Schena, G. Gaidano, and L. Bergui, 1989 *Human normal CD5+ B lymphocytes can be induced to differentiate to CD5- B lymphocytes with germinal center cell features.* Blood. **73**(5): p. 1259-1263.
 39. Zupo, S., M. Dono, R. Massara, G. Tadorelli, N. Chiorazzi, and M. Ferrarini, 1994 *Expression of CD5 and CD38 by human CD5- B cells: requirement for special stimuli.* Eur J Immunol. **24**(6): p. 1426-1433. doi: 10.1002/eji.1830240628.
 40. Ciccone, M., A. Ferrajoli, M.J. Keating, and G.A. Calin, 2014 *SnapShot: chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Cell. **26**(5): p. 770-770.e1. doi: 10.1016/j.ccell.2014.10.020. Epub 2014 Nov 10.
 41. Schmid, C. and P.G. Isaacson, 1994 *Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study.* Histopathology. **24**(5): p. 445-451.
 42. Caligaris-Cappio, F., 2003 *Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol. **123**(3): p. 380-388.
 43. Ciccone, M., C. Agostinelli, G.M. Rigolin, P.P. Piccaluga, F. Cavazzini, S. Righi, M.T. Sista, O. Sofritti, L. Rizzotto, E. Sabattini, G. Fioritoni, S. Falorio, C. Stelitano, A. Olivieri, I. Attolico, M. Brugiattelli, P.L. Zinzani, E. Saccenti, D. Capello, M. Negrini, A. Cuneo, and S. Pileri, 2012 *Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays.* Leukemia. **26**(3): p. 499-508. doi: 10.1038/leu.2011.247. Epub 2011 Sep 23.

44. Morrison, W.H., R.T. Hoppe, L.M. Weiss, V.J. Picozzi, Jr., and S.J. Horning, 1989 *Small lymphocytic lymphoma*. J Clin Oncol. **7**(5): p. 598-606. doi: 10.1200/JCO.1989.7.5.598.
45. Garcia, C.F., K.E. Hunt, H. Kang, A. Babb, J.M. Gale, M.A. Vasef, and K.K. Reichard, 2010 *Most morphologic features in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) do not reliably predict underlying FISH genetics or immunoglobulin heavy chain variable region somatic mutational status*. Appl Immunohistochem Mol Morphol. **18**(2): p. 119-127. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181bbd5d5.
46. Ben-Ezra, J., J.S. Burke, W.G. Swartz, M.D. Brownell, R.K. Brynes, L.R. Hill, B.N. Nathwani, M.M. Oken, B.C. Wolf, R. Woodruff, and et al., 1989 *Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases*. Blood. **73**(2): p. 579-587.
47. Asplund, S.L., R.W. McKenna, M.S. Howard, and S.H. Kroft, 2002 *Immunophenotype does not correlate with lymph node histology in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*. Am J Surg Pathol. **26**(5): p. 624-629.
48. Swerdlow, S.H., L.J. Murray, J.A. Habeshaw, and A.G. Stansfeld, 1984 *Lymphocytic lymphoma/B-chronic lymphocytic leukaemia--an immunohistopathological study of peripheral B lymphocyte neoplasia*. Br J Cancer. **50**(5): p. 587-599.
49. Gine, E., A. Martinez, N. Villamor, A. Lopez-Guillermo, M. Camos, D. Martinez, J. Esteve, X. Calvo, A. Muntanola, P. Abrisqueta, M. Rozman, C. Rozman, F. Bosch, E. Campo, and E. Montserrat, 2010 *Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior*. Haematologica. **95**(9): p. 1526-1533. doi: 10.3324/haematol.2010.022277. Epub 2010 Apr 26.
50. Gibson, S.E., R.J. Leeman-Neill, S. Jain, W. Piao, K.M. Cieply, and S.H. Swerdlow, 2016 *Proliferation centres of chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma have enhanced expression of MYC protein, which does not result from rearrangement or gain of the MYC gene*. Br J Haematol. **175**(1): p. 173-175. doi: 10.1111/bjh.13844. Epub 2015 Nov 16.

51. Igawa, T., Y. Sato, K. Takata, S. Fushimi, M. Tamura, N. Nakamura, Y. Maeda, Y. Orita, M. Tanimoto, and T. Yoshino, 2011 *Cyclin D2 is overexpressed in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*. *Cancer Sci.* **102**(11): p. 2103-2107. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02046.x. Epub 2011 Aug 24.
52. Gradowski, J.F., R.L. Sargent, F.E. Craig, K. Cieply, K. Fuhrer, C. Sherer, and S.H. Swerdlow, 2012 *Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with cyclin D1 positive proliferation centers do not have CCND1 translocations or gains and lack SOX11 expression*. *Am J Clin Pathol.* **138**(1): p. 132-139. doi: 10.1309/AJCPIVKZRMPF93ET.
53. Balogh, Z., L. Reiniger, H. Rajnai, J. Csomor, A. Szepesi, A. Balogh, L. Deak, E. Gagy, C. Bodor, and A. Matolcsy, 2011 *High rate of neoplastic cells with genetic abnormalities in proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma.* **52**(6): p. 1080-1084. doi: 10.3109/10428194.2011.555889. Epub 2011 Mar 21.
54. Garces, S., J.D. Khoury, R. Kanagal-Shamanna, A. Salem, S.A. Wang, C.Y. Ok, S. Hu, K.P. Patel, M.J. Routbort, R. Luthra, G. Tang, E.J. Schlette, C.E. Bueso-Ramos, L.J. Medeiros, and S. Loghavi, 2018 *Chronic lymphocytic leukemia with proliferation centers in bone marrow is associated with younger age at initial presentation, complex karyotype and TP53 disruption*. *Hum Pathol.* **4**(18): p. 30298-30303.
55. Friedlander, M.R., E. Lizano, A.J. Houben, D. Bezdan, M. Banez-Coronel, G. Kudla, E. Mateu-Huertas, B. Kagerbauer, J. Gonzalez, K.C. Chen, E.M. LeProust, E. Marti, and X. Estivill, 2014 *Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs*. *Genome Biol.* **15**(4): p. R57. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r57.
56. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, 1993 *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell.* **75**(5): p. 843-854.
57. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl, 2001 *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. *Science.* **294**(5543): p. 853-858.
58. Ambros, V., 2001 *microRNAs: tiny regulators with great potential*. *Cell.* **107**(7): p. 823-826.

59. Jopling, C.L., M. Yi, A.M. Lancaster, S.M. Lemon, and P. Sarnow, 2005 *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. Science. **309**(5740): p. 1577-1581.
60. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, 2007 *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science. **318**(5858): p. 1931-1934. Epub 2007 Nov 29.
61. Bartel, D.P., 2004 *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell. **116**(2): p. 281-297.
62. Wahid, F., A. Shehzad, T. Khan, and Y.Y. Kim, 2010 *MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*. Biochim Biophys Acta. **1803**(11): p. 1231-1243. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013. Epub 2010 Jul 7.
63. Chen, Y.T., O.W. Liew, and A.M. Richards, 2015 *MicroRNA expression profiles of human left ventricle derived cardiac cells in normoxic and hypoxic conditions*. Genom Data. **5:59-60**.(doi): p. 10.1016/j.gdata.2015.05.020. eCollection 2015 Sep.
64. Fedeli, M., M. Riba, J.M. Garcia Manteiga, L. Tian, V. Vigano, G. Rossetti, M. Pagani, C. Xiao, A. Liston, E. Stupka, D. Cittaro, S. Abrignani, P. Provero, P. Dellabona, and G. Casorati, 2016 *miR-17 approximately 92 family clusters control iNKT cell ontogenesis via modulation of TGF-beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. **113**(51): p. E8286-E8295. doi: 10.1073/pnas.1612024114. Epub 2016 Dec 5.
65. de Sousa, E., L.T. Walter, G.S. Higa, O.A. Casado, and A.H. Kihara, 2013 *Developmental and functional expression of miRNA-stability related genes in the nervous system*. PLoS One. **8**(5): p. e56908. doi: 10.1371/journal.pone.0056908. Print 2013.
66. Mukhopadhyay, P., G. Brock, V. Pihur, C. Webb, M.M. Pisano, and R.M. Greene, 2010 *Developmental microRNA expression profiling of murine embryonic orofacial tissue*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. **88**(7): p. 511-534. doi: 10.1002/bdra.20684.
67. Xiao, C., D.P. Calado, G. Galler, T.H. Thai, H.C. Patterson, J. Wang, N. Rajewsky, T.P. Bender, and K. Rajewsky, 2007 *MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb*. Cell. **131**(1): p. 146-159. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.021.

68. Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel, 2004 *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science. **303**(5654): p. 83-86. doi: 10.1126/science.1091903. Epub 2003 Dec 4.
69. Thai, T.H., D.P. Calado, S. Casola, K.M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J.L. Kutok, M. Schmidt-Supprian, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, and K. Rajewsky, 2007 *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. Science. **316**(5824): p. 604-608. doi: 10.1126/science.1141229.
70. Mehta, A., M. Mann, J.L. Zhao, G.K. Marinov, D. Majumdar, Y. Garcia-Flores, X. Du, E. Erikci, K. Chowdhury, and D. Baltimore, 2015 *The microRNA-212/132 cluster regulates B cell development by targeting Sox4*. J Exp Med. **212**(10): p. 1679-1692. doi: 10.1084/jem.20150489. Epub 2015 Sep 14.
71. Tan, L.P., M. Wang, J.L. Robertus, R.N. Schakel, J.H. Gibcus, A. Diepstra, G. Harms, S.C. Peh, R.M. Reijmers, S.T. Pals, B.J. Kroesen, P.M. Kluin, S. Poppema, and A. van den Berg, 2009 *miRNA profiling of B-cell subsets: specific miRNA profile for germinal center B cells with variation between centroblasts and centrocytes*. Lab Invest. **89**(6): p. 708-716. doi: 10.1038/labinvest.2009.26. Epub 2009 Apr 6.
72. Zhang, J., D.D. Jima, C. Jacobs, R. Fischer, E. Gottwein, G. Huang, P.L. Lugar, A.S. Lagoo, D.A. Rizzieri, D.R. Friedman, J.B. Weinberg, P.E. Lipsky, and S.S. Dave, 2009 *Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation*. Blood. **113**(19): p. 4586-4594. doi: 10.1182/blood-2008-09-178186. Epub 2009 Feb 6.
73. Malpeli, G., S. Barbi, S. Zupo, G. Tosadori, G. Scardoni, A. Bertolaso, S. Sartoris, S. Ugel, C. Vicentini, M. Fassan, A. Adamo, M. Krampera, M.T. Scupoli, C.M. Croce, and A. Scarpa, 2017 *Identification of microRNAs implicated in the late differentiation stages of normal B cells suggests a central role for miRNA targets ZEB1 and TP53*. Oncotarget. **8**(7): p. 11809-11826. doi: 10.18632/oncotarget.14683.
74. Mohr, A.M. and J.L. Mott, 2015 *Overview of microRNA biology*. Semin Liver Dis. **35**(1): p. 3-11. doi: 10.1055/s-0034-1397344. Epub 2015 Jan 29.
75. Yuan, X., N. Berg, J.W. Lee, T.T. Le, V. Neudecker, N. Jing, and H. Eltzschig, 2018 *MicroRNA miR-223 as regulator of innate immunity*. J Leukoc Biol. **3**(10): p. 3MR0218-079R.

76. Song, Z. and D. Liu, 2014 *ROLE OF microRNA IN SKIN DEVELOPMENT AND WOUND HEALING*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. **28**(7): p. 913-918.
77. Absalon, S., D.M. Kochanek, V. Raghavan, and A.M. Krichevsky, 2013 *MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons*. J Neurosci. **33**(37): p. 14645-14659. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1327-13.2013.
78. Rossetti, S. and N. Sacchi, 2013 *RUNX1: A microRNA hub in normal and malignant hematopoiesis*. Int J Mol Sci. **14**(1): p. 1566-1588. doi: 10.3390/ijms14011566.
79. Wan, S. and X. Yu, 2017 *Regulation of microRNA-17-92 cluster on bone development, remodeling, and metabolism*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. **31**(7): p. 870-875. doi: 10.7507/1002-1892.201701068.
80. Irani, S. and M.M. Hussain, 2015 *Role of microRNA-30c in lipid metabolism, adipogenesis, cardiac remodeling and cancer*. Curr Opin Lipidol. **26**(2): p. 139-146. doi: 10.1097/MOL.0000000000000162.
81. Xu, D. and H. Tahara, 2013 *The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging*. Adv Drug Deliv Rev. **65**(3): p. 368-375. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.010. Epub 2012 Jul 20.
82. Calore, F., F. Lovat, and M. Garofalo, 2013 *Non-coding RNAs and cancer*. Int J Mol Sci. **14**(8): p. 17085-17110. doi: 10.3390/ijms140817085.
83. Ambros, V., 2004 *The functions of animal microRNAs*. Nature. **431**(7006): p. 350-5.
84. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, 2004 *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA. **10**(2): p. 185-191.
85. Esquela-Kerscher, A., S.M. Johnson, L. Bai, K. Saito, J. Partridge, K.L. Reinert, and F.J. Slack, 2005 *Post-embryonic expression of C. elegans microRNAs belonging to the lin-4 and let-7 families in the hypodermis and the reproductive system*. Dev Dyn. **234**(4): p. 868-877.
86. Achard, P., A. Herr, D.C. Baulcombe, and N.P. Harberd, 2004 *Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA*. Development. **131**(14): p. 3357-3365.

87. Gregory, R.I., T.P. Chendrimada, and R. Shiekhattar, 2006 *MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex*. Methods Mol Biol. **342**: p. 33-47.
88. Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, and T.R. Golub, 2005 *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature. **435**(7043): p. 834-838.
89. Veronika, D., 2014 *Általános Genetika*. miRNS-ek keletkezése, érése és hatása 10.18.ábra.
90. Calin, G.A., C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C.M. Croce, 2002 *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(24): p. 15524-15529. Epub 2002 Nov 14.
91. Calin, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M.V. Iorio, R. Visone, N.I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce, 2005 *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med. **353**(17): p. 1793-1801.
92. Nakamura, T., E. Canaani, and C.M. Croce, 2007 *Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing*. Proc Natl Acad Sci U S A. **104**(26): p. 10980-10985. Epub 2007 Jun 20.
93. Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee, and P.A. Jones, 2006 *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell. **9**(6): p. 435-443.
94. Fabbri, M., C.M. Croce, and G.A. Calin, 2008 *MicroRNAs*. Cancer J. **14**(1): p. 1-6. doi: 10.1097/PPO.0b013e318164145e.
95. Curtale, G., 2018 *MiRNAs at the Crossroads between Innate Immunity and Cancer: Focus on Macrophages*. Cells. **7**(2).(pii): p. cells7020012. doi: 10.3390/cells7020012.

96. Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel, 2007 *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation*. Science. **315**(5818): p. 1576-1579. doi: 10.1126/science.1137999. Epub 2007 Feb 22.
97. Lee, Y.S. and A. Dutta, 2007 *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene*. Genes Dev. **21**(9): p. 1025-1030. doi: 10.1101/gad.1540407. Epub 2007 Apr 16.
98. Chin, L.J., E. Ratner, S. Leng, R. Zhai, S. Nallur, I. Babar, R.U. Muller, E. Straka, L. Su, E.A. Burki, R.E. Crowell, R. Patel, T. Kulkarni, R. Homer, D. Zeltermann, K.K. Kidd, Y. Zhu, D.C. Christiani, S.A. Belinsky, F.J. Slack, and J.B. Weidhaas, 2008 *A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk*. Cancer Res. **68**(20): p. 8535-8540. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2129.
99. O'Connell, R.M., K.D. Taganov, M.P. Boldin, G. Cheng, and D. Baltimore, 2007 *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A. **104**(5): p. 1604-1609. doi: 10.1073/pnas.0610731104. Epub 2007 Jan 22.
100. Martinez-Nunez, R.T., F. Louafi, and T. Sanchez-Elsner, 2011 *The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1)*. J Biol Chem. **286**(3): p. 1786-1794. doi: 10.1074/jbc.M110.169367. Epub 2010 Nov 19.
101. Banerjee, S., N. Xie, H. Cui, Z. Tan, S. Yang, M. Icyuz, E. Abraham, and G. Liu, 2013 *MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization*. J Immunol. **190**(12): p. 6542-6549. doi: 10.4049/jimmunol.1202496. Epub 2013 May 10.
102. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, 2007 *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods. **4**(9): p. 721-726. doi: 10.1038/nmeth1079. Epub 2007 Aug 12.
103. Lennox, K.A. and M.A. Behlke, 2010 *A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency*. Pharm Res. **27**(9): p. 1788-1799. doi: 10.1007/s11095-010-0156-0. Epub 2010 Apr 28.
104. Watashi, K., M.L. Yeung, M.F. Starost, R.S. Hosmane, and K.T. Jeang, 2010 *Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis*. J Biol Chem. **285**(32): p. 24707-24716. doi: 10.1074/jbc.M109.062976. Epub 2010 Jun 7.

105. Chen, Y., X. Zhu, X. Zhang, B. Liu, and L. Huang, 2010 *Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy*. Mol Ther. **18**(9): p. 1650-1656. doi: 10.1038/mt.2010.136. Epub 2010 Jul 6.
106. Frenquelli, M., M. Muzio, C. Scielzo, C. Fazi, L. Scarfo, C. Rossi, G. Ferrari, P. Ghia, and F. Caligaris-Cappio, 2010 *MicroRNA and proliferation control in chronic lymphocytic leukemia: functional relationship between miR-221/222 cluster and p27*. Blood. **115**(19): p. 3949-3959. doi: 10.1182/blood-2009-11-254656. Epub 2010 Mar 4.
107. Gaidano, G., R. Foa, and R. Dalla-Favera, 2012 *Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Invest. **122**(10): p. 3432-3438. doi: 10.1172/JCI64101. Epub 2012 Oct 1.
108. Kiefer, Y., C. Schulte, M. Tiemann, and J. Bullerdiek, 2012 *Chronic lymphocytic leukemia-associated chromosomal abnormalities and miRNA deregulation*. Appl Clin Genet. **5:21-5:28**,(doi): p. 10.2147/TACG.S18669. Print 2012.
109. Marton, S., M.R. Garcia, C. Robello, H. Persson, F. Trajtenberg, O. Pritsch, C. Rovira, H. Naya, G. Dighiero, and A. Cayota, 2008 *Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis*. Leukemia. **22**(2): p. 330-338. Epub 2007 Nov 8.
110. Wang, M., L.P. Tan, M.K. Dijkstra, K. van Lom, J.L. Robertus, G. Harms, T. Blokzijl, K. Kooistra, B. van T'Veer M, S. Rosati, L. Visser, M. Jongen-Lavrencic, P.M. Kluin, and A. van den Berg, 2008 *miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression*. J Pathol. **215**(1): p. 13-20. doi: 10.1002/path.2333.
111. Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, and C.M. Croce, 2006 *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. **103**(18): p. 7024-7029. doi: 10.1073/pnas.0602266103. Epub 2006 Apr 25.
112. Musilova, K. and M. Mraz, 2015 *MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex*. Leukemia. **29**(5): p. 1004-1017. doi: 10.1038/leu.2014.351. Epub 2014 Dec 26.

113. Elton, T.S., H. Selemon, S.M. Elton, and N.L. Parinandi, 2013 *Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes*. *Gene*. **532**(1): p. 1-12. doi: 10.1016/j.gene.2012.12.009. Epub 2012 Dec 14.
114. Yin, Q., X. Wang, J. McBride, C. Fewell, and E. Flemington, 2008 *B-cell receptor activation induces BIC/miR-155 expression through a conserved AP-1 element*. *J Biol Chem*. **283**(5): p. 2654-2662. doi: 10.1074/jbc.M708218200. Epub 2007 Nov 28.
115. Mraz, M. and T.J. Kipps, 2013 *MicroRNAs and B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*. **54**(8): p. 1836-1839. doi: 10.3109/10428194.2013.796055. Epub 2013 Jun 12.
116. Fang, Z.H., S.L. Wang, J.T. Zhao, Z.J. Lin, L.Y. Chen, R. Su, S.T. Xie, B.Z. Carter, and B. Xu, 2016 *miR-150 exerts antileukemia activity in vitro and in vivo through regulating genes in multiple pathways*. *Cell Death Dis*. **7**(9): p. e2371. doi: 10.1038/cddis.2016.256.
117. Mraz, M., L. Chen, L.Z. Rassenti, E.M. Ghia, H. Li, K. Jepsen, E.N. Smith, K. Messer, K.A. Frazer, and T.J. Kipps, 2014 *miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1*. *Blood*. **124**(1): p. 84-95. doi: 10.1182/blood-2013-09-527234. Epub 2014 May 1.
118. Zhou, K., Z. Yu, S. Yi, Z. Li, G. An, D. Zou, J. Qi, Y. Zhao, and L. Qiu, 2014 *miR-29c down-regulation is associated with disease aggressiveness and poor survival in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*. **55**(7): p. 1544-1550. doi: 10.3109/10428194.2013.855308. Epub 2014 Feb 4.
119. Papakonstantinou, N., S. Ntoufa, E. Chartomatsidou, G. Papadopoulos, A. Hatzigeorgiou, A. Anagnostopoulos, K. Chlichlia, P. Ghia, M. Muzio, C. Belessi, and K. Stamatopoulos, 2013 *Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia*. *Mol Med*. **19**:115-23.(doi): p. 10.2119/molmed.2013.00005.
120. Fassina, A., F. Marino, M. Siri, R. Zambello, L. Ventura, M. Fassan, F. Simonato, and R. Cappellesso, 2012 *The miR-17-92 microRNA cluster: a novel diagnostic tool in large B-cell malignancies*. *Lab Invest*. **92**(11): p. 1574-15782. doi: 10.1038/labinvest.2012.129. Epub 2012 Sep 10.

121. Fuziwara, C.S. and E.T. Kimura, 2015 *Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer*. Front Med (Lausanne). **2:64**.(doi): p. 10.3389/fmed.2015.00064. eCollection 2015.
122. Zou, Z.J., L. Fan, L. Wang, J. Xu, R. Zhang, T. Tian, J.Y. Li, and W. Xu, 2015 *miR-26a and miR-214 down-regulate expression of the PTEN gene in chronic lymphocytic leukemia, but not PTEN mutation or promoter methylation*. Oncotarget. **6**(2): p. 1276-1285. doi: 10.18632/oncotarget.2626.
123. Sander, S., L. Bullinger, and T. Wirth, 2009 *Repressing the repressor: a new mode of MYC action in lymphomagenesis*. Cell Cycle. **8**(4): p. 556-559. Epub 2009 Feb 10.
124. Kopparapu, P.K., S. Bhoi, L. Mansouri, L.S. Arabanian, K. Plevova, S. Pospisilova, A.M. Wasik, G.A. Croci, B. Sander, M. Paulli, R. Rosenquist, and M. Kanduri, 2016 *Epigenetic silencing of miR-26A1 in chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: Impact on EZH2 expression*. Epigenetics. **11**(5): p. 335-343. doi: 10.1080/15592294.2016.1164375. Epub 2016 Apr 6.
125. Jorgensen, L.K., M.O. Poulsen, M.B. Laursen, S.C. Marques, H.E. Johnsen, M. Bogsted, and K. Dybkaer, 2015 *MicroRNAs as novel biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma--a systematic review*. Dan Med J. **62**(5).(pii): p. A5048.
126. Fabbri, M. and C.M. Croce, 2011 *Role of microRNAs in lymphoid biology and disease*. Curr Opin Hematol. **18**(4): p. 266-272. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283476012.
127. Garzon, R., F. Pichiorri, T. Palumbo, M. Visentini, R. Aqeilan, A. Cimmino, H. Wang, H. Sun, S. Volinia, H. Alder, G.A. Calin, C.G. Liu, M. Andreeff, and C.M. Croce, 2007 *MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia*. Oncogene. **26**(28): p. 4148-4157. doi: 10.1038/sj.onc.1210186. Epub 2007 Jan 29.
128. Favreau, A.J. and P. Sathyanarayana, 2012 *miR-590-5p, miR-219-5p, miR-15b and miR-628-5p are commonly regulated by IL-3, GM-CSF and G-CSF in acute myeloid leukemia*. Leuk Res. **36**(3): p. 334-341. doi: 10.1016/j.leukres.2011.09.027. Epub 2011 Oct 19.
129. Gounaris-Shannon, S. and T. Chevassut, 2013 *The Role of miRNA in Haematological Malignancy*. Bone Marrow Res. **2013:269107**.(doi): p. 10.1155/2013/269107. Epub 2013 Dec 12.

130. Mazan-Mamczarz, K. and R.B. Gartenhaus, 2013 *Role of microRNA deregulation in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*. Leuk Res. **37**(11): p. 1420-1428. doi: 10.1016/j.leukres.2013.08.020. Epub 2013 Sep 7.
131. Zanette, D.L., F. Rivadavia, G.A. Molfetta, F.G. Barbuzano, R. Proto-Siqueira, W.A. Silva, Jr., R.P. Falcao, and M.A. Zago, 2007 *miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia*. Braz J Med Biol Res. **40**(11): p. 1435-1440.
132. Cardoso, C., C. Mignon, G. Hetet, B. Grandchamps, M. Fontes, and L. Colleaux, 2000 *The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders*. Eur J Hum Genet. **8**(3): p. 174-180.
133. Simon, J.A. and C.A. Lange, 2008 *Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics*. Mutat Res. **647**(1-2): p. 21-29. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010. Epub 2008 Aug 3.
134. Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang, 2002 *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science. **298**(5595): p. 1039-1043. Epub 2002 Sep 26.
135. Czermin, B., R. Melfi, D. McCabe, V. Seitz, A. Imhof, and V. Pirrotta, 2002 *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell. **111**(2): p. 185-196.
136. Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg, 2002 *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev. **16**(22): p. 2893-2905.
137. Muller, J., C.M. Hart, N.J. Francis, M.L. Vargas, A. Sengupta, B. Wild, E.L. Miller, M.B. O'Connor, R.E. Kingston, and J.A. Simon, 2002 *Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex*. Cell. **111**(2): p. 197-208.
138. Sauvageau, M. and G. Sauvageau, 2010 *Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer*. Cell Stem Cell. **7**(3): p. 299-313. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.002.

139. Caretti, G., M. Di Padova, B. Micales, G.E. Lyons, and V. Sartorelli, 2004 *The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation*. Genes Dev. **18**(21): p. 2627-2638.
140. Kalantry, S. and T. Magnuson, 2006 *The Polycomb group protein EED is dispensable for the initiation of random X-chromosome inactivation*. PLoS Genet. **2**(5): p. e66. Epub 2006 May 5.
141. Seki, Y., M. Yamaji, Y. Yabuta, M. Sano, M. Shigeta, Y. Matsui, Y. Saga, M. Tachibana, Y. Shinkai, and M. Saitou, 2007 *Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice*. Development. **134**(14): p. 2627-2638. Epub 2007 Jun 13.
142. Valk-Lingbeek, M.E., S.W. Bruggeman, and M. van Lohuizen, 2004 *Stem cells and cancer; the polycomb connection*. Cell. **118**(4): p. 409-18.
143. Lee, J., M.J. Son, K. Woolard, N.M. Donin, A. Li, C.H. Cheng, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, J. Walling, S. Ahn, M. Kim, M. Totonchy, T. Cusack, C. Ene, H. Ma, Q. Su, J.C. Zenklusen, W. Zhang, D. Maric, and H.A. Fine, 2008 *Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells*. Cancer Cell. **13**(1): p. 69-80. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.005.
144. Benetatos, L., G. Vartholomatos, and E. Hatzimichael, 2014 *Polycomb group proteins and MYC: the cancer connection*. Cell Mol Life Sci. **71**(2): p. 257-269. doi: 10.1007/s00018-013-1426-x. Epub 2013 Jul 30.
145. Yu, J., Q. Cao, R. Mehra, B. Laxman, J. Yu, S.A. Tomlins, C.J. Creighton, S.M. Dhanasekaran, R. Shen, G. Chen, D.S. Morris, V.E. Marquez, R.B. Shah, D. Ghosh, S. Varambally, and A.M. Chinnaiyan, 2007 *Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer*. Cancer Cell. **12**(5): p. 419-431.
146. Min, J., A. Zaslavsky, G. Fedele, S.K. McLaughlin, E.E. Reczek, T. De Raedt, I. Guney, D.E. Storchlic, L.E. Macconail, R. Beroukhi, R.T. Bronson, S. Ryeom, W.C. Hahn, M. Loda, and K. Cichowski, 2010 *An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB*. Nat Med. **16**(3): p. 286-294. doi: 10.1038/nm.2100. Epub 2010 Feb 14.
147. Lu, C., H.D. Han, L.S. Mangala, R. Ali-Fehmi, C.S. Newton, L. Ozbun, G.N. Armaiz-Pena, W. Hu, R.L. Stone, A. Munkarah, M.K. Ravoori, M.M. Shahzad,

- J.W. Lee, E. Mora, R.R. Langley, A.R. Carroll, K. Matsuo, W.A. Spannuth, R. Schmandt, N.B. Jennings, B.W. Goodman, R.B. Jaffe, A.M. Nick, H.S. Kim, E.O. Guven, Y.H. Chen, L.Y. Li, M.C. Hsu, R.L. Coleman, G.A. Calin, E.B. Denkbass, J.Y. Lim, J.S. Lee, V. Kundra, M.J. Birrer, M.C. Hung, G. Lopez-Berestein, and A.K. Sood, 2010 *Regulation of tumor angiogenesis by EZH2*. *Cancer Cell*. **18**(2): p. 185-197. doi: 10.1016/j.ccr.2010.06.016.
148. van Kemenade, F.J., F.M. Raaphorst, T. Blokzijl, E. Fieret, K.M. Hamer, D.P. Satijn, A.P. Otte, and C.J. Meijer, 2001 *Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Blood*. **97**(12): p. 3896-3901.
 149. Caganova, M., C. Carrisi, G. Varano, F. Mainoldi, F. Zanardi, P.L. Germain, L. George, F. Alberghini, L. Ferrarini, A.K. Talukder, M. Ponzoni, G. Testa, T. Nojima, C. Doglioni, D. Kitamura, K.M. Toellner, I.H. Su, and S. Casola, 2013 *Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis*. *J Clin Invest*. **123**(12): p. 5009-5022. doi: 10.1172/JCI70626. Epub 2013 Nov 8.
 150. Majer, C.R., L. Jin, M.P. Scott, S.K. Knutson, K.W. Kuntz, H. Keilhack, J.J. Smith, M.P. Moyer, V.M. Richon, R.A. Copeland, and T.J. Wigle, 2012 *A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients*. *FEBS Lett*. **586**(19): p. 3448-3451. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.066. Epub 2012 Jul 28.
 151. Sneeringer, C.J., M.P. Scott, K.W. Kuntz, S.K. Knutson, R.M. Pollock, V.M. Richon, and R.A. Copeland, 2010 *Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(49): p. 20980-20985. doi: 10.1073/pnas.1012525107. Epub 2010 Nov 15.
 152. Wigle, T.J., S.K. Knutson, L. Jin, K.W. Kuntz, R.M. Pollock, V.M. Richon, R.A. Copeland, and M.P. Scott, 2011 *The Y641C mutation of EZH2 alters substrate specificity for histone H3 lysine 27 methylation states*. *FEBS Lett*. **585**(19): p. 3011-3014. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.018. Epub 2011 Aug 17.
 153. Bracken, A.P., D. Pasini, M. Capra, E. Prosperini, E. Colli, and K. Helin, 2003 *EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer*. *EMBO J*. **22**(20): p. 5323-5335.
 154. Coe, B.P., K.L. Thu, S. Aviel-Ronen, E.A. Vucic, A.F. Gazdar, S. Lam, M.S. Tsao, and W.L. Lam, 2013 *Genomic deregulation of the E2F/Rb pathway leads*

- to activation of the oncogene *EZH2* in small cell lung cancer. *PLoS One*. **8**(8): p. e71670. doi: 10.1371/journal.pone.0071670. eCollection 2013.
155. Zhao, X., T. Lwin, X. Zhang, A. Huang, J. Wang, V.E. Marquez, S. Chen-Kiang, W.S. Dalton, E. Sotomayor, and J. Tao, 2013 *Disruption of the MYC-miRNA-EZH2 loop to suppress aggressive B-cell lymphoma survival and clonogenicity*. *Leukemia*. **27**(12): p. 2341-2350. doi: 10.1038/leu.2013.94. Epub 2013 Mar 29.
 156. Zhang, X., X. Zhao, W. Fiskus, J. Lin, T. Lwin, R. Rao, Y. Zhang, J.C. Chan, K. Fu, V.E. Marquez, S. Chen-Kiang, L.C. Moscinski, E. Seto, W.S. Dalton, K.L. Wright, E. Sotomayor, K. Bhalla, and J. Tao, 2012 *Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas*. *Cancer Cell*. **22**(4): p. 506-523. doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.003.
 157. Majewski, I.J., M.E. Ritchie, B. Phipson, J. Corbin, M. Pakusch, A. Ebert, M. Busslinger, H. Koseki, Y. Hu, G.K. Smyth, W.S. Alexander, D.J. Hilton, and M.E. Blewitt, 2010 *Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells*. *Blood*. **116**(5): p. 731-739. doi: 10.1182/blood-2009-12-260760. Epub 2010 May 5.
 158. Kamminga, L.M., L.V. Bystrykh, A. de Boer, S. Houwer, J. Douma, E. Weersing, B. Dontje, and G. de Haan, 2006 *The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion*. *Blood*. **107**(5): p. 2170-2179. doi: 10.1182/blood-2005-09-3585. Epub 2005 Nov 17.
 159. Mochizuki-Kashio, M., Y. Mishima, S. Miyagi, M. Negishi, A. Saraya, T. Konuma, J. Shinga, H. Koseki, and A. Iwama, 2011 *Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells*. *Blood*. **118**(25): p. 6553-6561. doi: 10.1182/blood-2011-03-340554. Epub 2011 Oct 31.
 160. Xie, H., J. Xu, J.H. Hsu, M. Nguyen, Y. Fujiwara, C. Peng, and S.H. Orkin, 2014 *Polycomb repressive complex 2 regulates normal hematopoietic stem cell function in a developmental-stage-specific manner*. *Cell Stem Cell*. **14**(1): p. 68-80. doi: 10.1016/j.stem.2013.10.001. Epub 2013 Nov 14.
 161. Good-Jacobson, K.L., 2014 *Regulation of germinal center, B-cell memory, and plasma cell formation by histone modifiers*. *Front Immunol*. **5**:596.(doi): p. 10.3389/fimmu.2014.00596. eCollection 2014.

162. Baxter, J., S. Sauer, A. Peters, R. John, R. Williams, M.L. Caparros, K. Arney, A. Otte, T. Jenuwein, M. Merkenschlager, and A.G. Fisher, 2004 *Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes*. EMBO J. **23**(22): p. 4462-4472. doi: 10.1038/sj.emboj.7600414. Epub 2004 Oct 28.
163. Su, I.H., A. Basavaraj, A.N. Krutchinsky, O. Hobert, A. Ullrich, B.T. Chait, and A. Tarakhovsky, 2003 *Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement*. Nat Immunol. **4**(2): p. 124-131. doi: 10.1038/ni876. Epub 2002 Dec 23.
164. Abd Al Kader, L., T. Oka, K. Takata, X. Sun, H. Sato, I. Murakami, T. Toji, A. Manabe, H. Kimura, and T. Yoshino, 2013 *In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2*. Virchows Arch. **463**(5): p. 697-711. doi: 10.1007/s00428-013-1428-y. Epub 2013 Aug 16.
165. van Galen, J.C., J.J. Muris, J.J. Oudejans, W. Vos, C.P. Giroth, G.J. Ossenkoppele, A.P. Otte, F.M. Raaphorst, and C.J. Meijer, 2007 *Expression of the polycomb-group gene BMI1 is related to an unfavourable prognosis in primary nodal DLBCL*. J Clin Pathol. **60**(2): p. 167-172. doi: 10.1136/jcp.2006.038752. Epub 2006 Jul 12.
166. Chen, J., J. Li, Q. Han, Z. Sun, J. Wang, S. Wang, and R.C. Zhao, 2012 *Enhancer of zeste homolog 2 is overexpressed and contributes to epigenetic inactivation of p21 and phosphatase and tensin homolog in B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Exp Biol Med (Maywood). **237**(9): p. 1110-1116. doi: 10.1258/ebm.2012.012075. Epub 2012 Sep 6.
167. Zhan, F., J. Hardin, B. Kordsmeier, K. Bumm, M. Zheng, E. Tian, R. Sanderson, Y. Yang, C. Wilson, M. Zangari, E. Anaissie, C. Morris, F. Muwalla, F. van Rhee, A. Fassas, J. Crowley, G. Tricot, B. Barlogie, and J. Shaughnessy, Jr., 2002 *Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells*. Blood. **99**(5): p. 1745-1757.
168. Morin, R.D., N.A. Johnson, T.M. Severson, A.J. Mungall, J. An, R. Goya, J.E. Paul, M. Boyle, B.W. Woolcock, F. Kuchenbauer, D. Yap, R.K. Humphries, O.L. Griffith, S. Shah, H. Zhu, M. Kimbara, P. Shashkin, J.F. Charlot, M. Tcherpakov, R. Corbett, A. Tam, R. Varhol, D. Smailus, M. Moksa, Y. Zhao, A.

- Delaney, H. Qian, I. Birol, J. Schein, R. Moore, R. Holt, D.E. Horsman, J.M. Connors, S. Jones, S. Aparicio, M. Hirst, R.D. Gascoyne, and M.A. Marra, 2010 *Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin*. Nat Genet. **42**(2): p. 181-185. doi: 10.1038/ng.518. Epub 2010 Jan 17.
169. Rabello Ddo, A., A.R. Lucena-Araujo, J.C. Alves-Silva, V.B. da Eira, M.C. de Vasconcellos, F.M. de Oliveira, E.M. Rego, F. Saldanha-Araujo, and F. Pittella Silva, 2015 *Overexpression of EZH2 associates with a poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood Cells Mol Dis. **54**(1): p. 97-102. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.07.013. Epub 2014 Aug 15.
170. Papakonstantinou, N., S. Ntoufa, E. Chartomatsidou, K. Kotta, A. Agathangelidis, L. Giassafaki, T. Karamanli, P. Bele, T. Moysiadis, P. Baliakas, L.A. Sutton, N. Stavroyianni, A. Anagnostopoulos, A.M. Makris, P. Ghia, R. Rosenquist, and K. Stamatopoulos, 2016 *The histone methyltransferase EZH2 as a novel prosurvival factor in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia*. Oncotarget. **7**(24): p. 35946-35959. doi: 10.18632/oncotarget.9371.
171. Kanduri, M., B. Sander, S. Ntoufa, N. Papakonstantinou, L.A. Sutton, K. Stamatopoulos, C. Kanduri, and R. Rosenquist, 2013 *A key role for EZH2 in epigenetic silencing of HOX genes in mantle cell lymphoma*. Epigenetics. **8**(12): p. 1280-1288. doi: 10.4161/epi.26546. Epub 2013 Oct 9.
172. Lu, J., M.L. He, L. Wang, Y. Chen, X. Liu, Q. Dong, Y.C. Chen, Y. Peng, K.T. Yao, H.F. Kung, and X.P. Li, 2011 *MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2*. Cancer Res. **71**(1): p. 225-233. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1850.
173. Sander, S., L. Bullinger, K. Klapproth, K. Fiedler, H.A. Kestler, T.F. Barth, P. Moller, S. Stilgenbauer, J.R. Pollack, and T. Wirth, 2008 *MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a*. Blood. **112**(10): p. 4202-4212. doi: 10.1182/blood-2008-03-147645. Epub 2008 Aug 19.
174. O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang, and J.T. Mendell, 2005 *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature. **435**(7043): p. 839-843.
175. Beguelin, W., M.A. Rivas, M.T. Calvo Fernandez, M. Teater, A. Purwada, D. Redmond, H. Shen, M.F. Challman, O. Elemento, A. Singh, and A.M. Melnick, 2017 *EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of*

- CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop*. Nat Commun. **8**(1): p. 877. doi: 10.1038/s41467-017-01029-x.
176. Du, W. and J. Pogoriler, 2006 *Retinoblastoma family genes*. Oncogene. **25**(38): p. 5190-5200.
 177. Giacinti, C. and A. Giordano, 2006 *RB and cell cycle progression*. Oncogene. **25**(38): p. 5220-5227.
 178. Wilson, B.G., X. Wang, X. Shen, E.S. McKenna, M.E. Lemieux, Y.J. Cho, E.C. Koellhoffer, S.L. Pomeroy, S.H. Orkin, and C.W. Roberts, 2010 *Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation*. Cancer Cell. **18**(4): p. 316-328. doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.006.
 179. Bodor, C., V. Grossmann, N. Popov, J. Okosun, C. O'Riain, K. Tan, J. Marzec, S. Araf, J. Wang, A.M. Lee, A. Clear, S. Montoto, J. Matthews, S. Iqbal, H. Rajnai, A. Rosenwald, G. Ott, E. Campo, L.M. Rimsza, E.B. Smeland, W.C. Chan, R.M. Braziel, L.M. Staudt, G. Wright, T.A. Lister, O. Elemento, R. Hills, J.G. Gribben, C. Chelala, A. Matolcsy, A. Kohlmann, T. Haferlach, R.D. Gascoyne, and J. Fitzgibbon, 2013 *EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma*. Blood. **122**(18): p. 3165-3168. doi: 10.1182/blood-2013-04-496893. Epub 2013 Sep 19.
 180. Okosun, J., C. Bodor, J. Wang, S. Araf, C.Y. Yang, C. Pan, S. Boller, D. Cittaro, M. Bozek, S. Iqbal, J. Matthews, D. Wrench, J. Marzec, K. Tawana, N. Popov, C. O'Riain, D. O'Shea, E. Carlotti, A. Davies, C.H. Lawrie, A. Matolcsy, M. Calaminici, A. Norton, R.J. Byers, C. Mein, E. Stupka, T.A. Lister, G. Lenz, S. Montoto, J.G. Gribben, Y. Fan, R. Grosschedl, C. Chelala, and J. Fitzgibbon, 2014 *Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma*. Nat Genet. **46**(2): p. 176-181. doi: 10.1038/ng.2856. Epub 2013 Dec 22.
 181. Damm, F., F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, and O.A. Bernard, 2012 *Spliceosome and other novel mutations in chronic lymphocytic leukemia and myeloid malignancies*. Leukemia. **26**(9): p. 2027-2031. doi: 10.1038/leu.2012.86. Epub 2012 Apr 9.
 182. Hebbard, L., G. Cecena, J. Golas, J. Sawada, L.G. Ellies, A. Charbono, R. Williams, R.E. Jimenez, M. Wankell, K.T. Arndt, S.Q. DeJoy, R.A. Rollins, V. Diesl, M. Follettie, L. Chen, E. Rosfjord, R.D. Cardiff, M. Komatsu, F. Boschelli, and R.G. Oshima, 2011 *Control of mammary tumor differentiation by*

- SKI-606 (bosutinib)*. *Oncogene*. **30**(3): p. 301-312. doi: 10.1038/onc.2010.412. Epub 2010 Sep 6.
183. Huang, W.Y., P.M. Yang, Y.F. Chang, V.E. Marquez, and C.C. Chen, 2011 *Methotrexate induces apoptosis through p53/p21-dependent pathway and increases E-cadherin expression through downregulation of HDAC/EZH2*. *Biochem Pharmacol*. **81**(4): p. 510-517. doi: 10.1016/j.bcp.2010.11.014. Epub 2010 Nov 27.
 184. Varambally, S., S.M. Dhanasekaran, M. Zhou, T.R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M.G. Sanda, D. Ghosh, K.J. Pienta, R.G. Sewalt, A.P. Otte, M.A. Rubin, and A.M. Chinnaiyan, 2002 *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. *Nature*. **419**(6907): p. 624-629. doi: 10.1038/nature01075.
 185. Chen, Y., M.C. Lin, H. Yao, H. Wang, A.Q. Zhang, J. Yu, C.K. Hui, G.K. Lau, M.L. He, J. Sung, and H.F. Kung, 2007 *Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin*. *Hepatology*. **46**(1): p. 200-208. doi: 10.1002/hep.21668.
 186. Miranda, T.B., C.C. Cortez, C.B. Yoo, G. Liang, M. Abe, T.K. Kelly, V.E. Marquez, and P.A. Jones, 2009 *DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation*. *Mol Cancer Ther*. **8**(6): p. 1579-1588. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0013. Epub 2009 Jun 9.
 187. McCabe, M.T., H.M. Ott, G. Ganji, S. Korenchuk, C. Thompson, G.S. Van Aller, Y. Liu, A.P. Graves, A. Della Pietra, 3rd, E. Diaz, L.V. LaFrance, M. Mellinger, C. Duquenne, X. Tian, R.G. Kruger, C.F. McHugh, M. Brandt, W.H. Miller, D. Dhanak, S.K. Verma, P.J. Tummino, and C.L. Creasy, 2012 *EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations*. *Nature*. **492**(7427): p. 108-112. doi: 10.1038/nature11606. Epub 2012 Oct 10.
 188. Knutson, S.K., T.J. Wigle, N.M. Warholic, C.J. Sneeringer, C.J. Allain, C.R. Klaus, J.D. Sacks, A. Raimondi, C.R. Majer, J. Song, M.P. Scott, L. Jin, J.J. Smith, E.J. Olhava, R. Chesworth, M.P. Moyer, V.M. Richon, R.A. Copeland, H. Keilhack, R.M. Pollock, and K.W. Kuntz, 2012 *A selective inhibitor of EZH2*

- blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells.* Nat Chem Biol. **8**(11): p. 890-896. doi: 10.1038/nchembio.1084. Epub 2012 Sep 30.
189. Kim, K., I. Jutooru, G. Chadalapaka, G. Johnson, J. Frank, R. Burghardt, S. Kim, and S. Safe, 2013 *HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer.* Oncogene. **32**(13): p. 1616-1625. doi: 10.1038/onc.2012.193. Epub 2012 May 21.
 190. Kaneko, S., G. Li, J. Son, C.F. Xu, R. Margueron, T.A. Neubert, and D. Reinberg, 2010 *Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA.* Genes Dev. **24**(23): p. 2615-2620. doi: 10.1101/gad.1983810.
 191. Han Li, C. and Y. Chen, 2015 *Targeting EZH2 for cancer therapy: progress and perspective.* Curr Protein Pept Sci. **16**(6): p. 559-570.
 192. Wei, Y., Y.H. Chen, L.Y. Li, J. Lang, S.P. Yeh, B. Shi, C.C. Yang, J.Y. Yang, C.Y. Lin, C.C. Lai, and M.C. Hung, 2011 *CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.* Nat Cell Biol. **13**(1): p. 87-94. doi: 10.1038/ncb2139. Epub 2010 Dec 5.
 193. E.S. Jaffe, Harris. N.L., Stein, H., Vardiman, J.W. 2001 *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* IARC.
 194. E.C. S. Swerdlow, N. Lee Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J.W. Vardiman. 2008 *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*, IARC.
 195. Kramer, M.F., 2011 *Stem-loop RT-qPCR for miRNAs.* Curr Protoc Mol Biol. Chapter(15): p. Unit 15.10. doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
 196. Fulci, V., S. Chiaretti, M. Goldoni, G. Azzalin, N. Carucci, S. Tavoraro, L. Castellano, A. Magrelli, F. Citarella, M. Messina, R. Maggio, N. Peragine, S. Santangelo, F.R. Mauro, P. Landgraf, T. Tuschl, D.B. Weir, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, A. Guarini, R. Foa, and G. Macino, 2007 *Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia.* Blood. **109**(11): p. 4944-4951. Epub 2007 Feb 27.
 197. József, S., 2014 9. *A génszerkezet vizsgálómódszerei I.: DNS-szakaszok in vivo és in vitro amplifikációja* 91. o. 9.3 Ábra, in *Molekuláris sejtbiológia*, D.C. Kiadó, Editor.

198. Yuan, J.S., A. Reed, F. Chen, and C.N. Stewart, Jr., 2006 *Statistical analysis of real-time PCR data*. BMC Bioinformatics. **7**:85.(doi): p. 10.1186/1471-2105-7-85.
199. Ramon Goni, P.G.a.S.F., 2009 *The qPCR data statistical analysis* Integromics White Paper
200. Deane, M. and J.D. Norton, 1990 *Immunoglobulin heavy chain variable region family usage is independent of tumor cell phenotype in human B lineage leukemias*. Eur J Immunol. **20**(10): p. 2209-2217.
201. Ciccone, M. and G.A. Calin, 2016 *MicroRNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia: An Old Disease with New Genetic Insights*. Microna. **5**(2): p. 106-112.
202. Bonato, M., S. Pittaluga, A. Tierens, A. Criel, G. Verhoef, I. Wlodarska, L. Vanutysel, L. Michaux, P. Vandekerckhove, H. Van den Berghe, and C. De Wolf-Peeters, 1998 *Lymph node histology in typical and atypical chronic lymphocytic leukemia*. Am J Surg Pathol. **22**(1): p. 49-56.
203. Damle, R.N., F. Ghiotto, A. Valetto, E. Albesiano, F. Fais, X.J. Yan, C.P. Sison, S.L. Allen, J. Kolitz, P. Schulman, V.P. Vinciguerra, P. Budde, J. Frey, K.R. Rai, M. Ferrarini, and N. Chiorazzi, 2002 *B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes*. Blood. **99**(11): p. 4087-4093.
204. Lampert, I.A., A. Wotherspoon, S. Van Noorden, and R.P. Hasserjian, 1999 *High expression of CD23 in the proliferation centers of chronic lymphocytic leukemia in lymph nodes and spleen*. Hum Pathol. **30**(6): p. 648-654.
205. Mu, P., Y.C. Han, D. Betel, E. Yao, M. Squatrito, P. Ogradowski, E. de Stanchina, A. D'Andrea, C. Sander, and A. Ventura, 2009 *Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas*. Genes Dev. **23**(24): p. 2806-2811. doi: 10.1101/gad.1872909.
206. Li, M., X. Guan, Y. Sun, J. Mi, X. Shu, F. Liu, and C. Li, 2014 *miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis*. Exp Cell Res. **323**(1): p. 1-6. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.025. Epub 2014 Jan 4.
207. Zou, Z.J., R. Zhang, L. Fan, L. Wang, C. Fang, L.N. Zhang, S. Yang, Y.Y. Li, J.Y. Li, and W. Xu, 2013 *Low expression level of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten predicts poor prognosis in chronic*

- lymphocytic leukemia*. *Leuk Lymphoma*. **54**(6): p. 1159-1164. doi: 10.3109/10428194.2012.733880. Epub 2012 Oct 16.
208. Jia, Q., H. Sun, F. Xiao, Y. Sai, Q. Li, X. Zhang, S. Yang, H. Wang, H. Wang, Y. Yang, C.T. Wu, and L. Wang, 2017 *miR-17-92 promotes leukemogenesis in chronic myeloid leukemia via targeting A20 and activation of NF-kappaB signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*. **487**(4): p. 868-874. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.144. Epub 2017 Apr 28.
209. Stamatopoulos, B., M. Van Damme, E. Crompot, B. Dessars, H.E. Housni, P. Mineur, N. Meuleman, D. Bron, and L. Lagneaux, 2015 *Opposite Prognostic Significance of Cellular and Serum Circulating MicroRNA-150 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Mol Med*. **21**:123-33.(doi): p. 10.2119/molmed.2014.00214.
210. Watanabe, A., H. Tagawa, J. Yamashita, K. Teshima, M. Nara, K. Iwamoto, M. Kume, Y. Kameoka, N. Takahashi, T. Nakagawa, N. Shimizu, and K. Sawada, 2011 *The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma*. *Leukemia*. **25**(8): p. 1324-1334. doi: 10.1038/leu.2011.81. Epub 2011 Apr 19.
211. Zhang, B., X.X. Liu, J.R. He, C.X. Zhou, M. Guo, M. He, M.F. Li, G.Q. Chen, and Q. Zhao, 2011 *Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer*. *Carcinogenesis*. **32**(1): p. 2-9. doi: 10.1093/carcin/bgq209. Epub 2010 Oct 15.
212. Puente, X.S., M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G.R. Ordonez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J.M. Tubio, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J.M. Hernandez, D.A. Puente, J.M. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A. Enjuanes, L. Hernandez, J. Yague, P. Nicolas, C.M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J.C. Dohm, S. de Sanjose, M.A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J.L. Gelpi, D. Torrents, M. Orozco, D.G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L.A. Stebbings, P.A. Futreal, M.R. Stratton, P.J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin, and E. Campo, 2011 *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. *Nature*. **475**(7354): p. 101-105. doi: 10.1038/nature10113.

213. Wang, L., M.S. Lawrence, Y. Wan, P. Stojanov, C. Sougnez, K. Stevenson, L. Werner, A. Sivachenko, D.S. DeLuca, L. Zhang, W. Zhang, A.R. Vartanov, S.M. Fernandes, N.R. Goldstein, E.G. Folco, K. Cibulskis, B. Tesar, Q.L. Sievers, E. Shefler, S. Gabriel, N. Hacohen, R. Reed, M. Meyerson, T.R. Golub, E.S. Lander, D. Neuberg, J.R. Brown, G. Getz, and C.J. Wu, 2011 *SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med. **365**(26): p. 2497-2506. doi: 10.1056/NEJMoal109016. Epub 2011 Dec 12.
214. Schuh, A., J. Becq, S. Humphray, A. Alexa, A. Burns, R. Clifford, S.M. Feller, R. Grocock, S. Henderson, I. Khrebtukova, Z. Kingsbury, S. Luo, D. McBride, L. Murray, T. Menju, A. Timbs, M. Ross, J. Taylor, and D. Bentley, 2012 *Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns*. Blood. **120**(20): p. 4191-4196. doi: 10.1182/blood-2012-05-433540. Epub 2012 Aug 22.
215. Braun, F.K., R. Mathur, L. Sehgal, R. Wilkie-Grantham, J. Chandra, Z. Berkova, and F. Samaniego, 2015 *Inhibition of methyltransferases accelerates degradation of cFLIP and sensitizes B-cell lymphoma cells to TRAIL-induced apoptosis*. PLoS One. **10**(3): p. e0117994. doi: 10.1371/journal.pone.0117994. eCollection 2015.
216. Beguelin, W., R. Popovic, M. Teater, Y. Jiang, K.L. Bunting, M. Rosen, H. Shen, S.N. Yang, L. Wang, T. Ezponda, E. Martinez-Garcia, H. Zhang, Y. Zheng, S.K. Verma, M.T. McCabe, H.M. Ott, G.S. Van Aller, R.G. Kruger, Y. Liu, C.F. McHugh, D.W. Scott, Y.R. Chung, N. Kelleher, R. Shaknovich, C.L. Creasy, R.D. Gascoyne, K.K. Wong, L. Cerchietti, R.L. Levine, O. Abdel-Wahab, J.D. Licht, O. Elemento, and A.M. Melnick, 2013 *EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation*. Cancer Cell. **23**(5): p. 677-692. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
217. Samaka, R.M., H.A. Aiad, M.A. Kandil, N.Y. Asaad, and N.S. Holah, 2015 *The Prognostic Role and Relationship between E2F1 and SV40 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma of Egyptian Patients*. Anal Cell Pathol (Amst). **2015:919834**.(doi): p. 10.1155/2015/919834. Epub 2015 Oct 27.
218. Calado, D.P., Y. Sasaki, S.A. Godinho, A. Pellerin, K. Kochert, B.P. Sleckman, I.M. de Alboran, M. Janz, S. Rodig, and K. Rajewsky, 2012 *The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal*

- centers*. Nat Immunol. **13**(11): p. 1092-1100. doi: 10.1038/ni.2418. Epub 2012 Sep 23.
219. Cattoretti, G., 2013 *MYC expression and distribution in normal mature lymphoid cells*. J Pathol. **229**(3): p. 430-440. doi: 10.1002/path.4141.
 220. Hamblin, T.J., Z. Davis, A. Gardiner, D.G. Oscier, and F.K. Stevenson, 1999 *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood. **94**(6): p. 1848-1854.
 221. Smit, L.A., F. van Maldegem, A.W. Langerak, C.E. van der Schoot, M.J. de Wit, S. Bea, E. Campo, R.J. Bende, and C.J. van Noesel, 2006 *Antigen receptors and somatic hypermutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia with Richter's transformation*. Haematologica. **91**(7): p. 903-911.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában:

Kinga Szurián, Irén Csala, Violetta Piurkó, Linda Deák, András Matolcsy, Lilla Reiniger (2017) Quantitative miR analysis in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma – proliferation centres are characterized by high miR-92a and miR-155 and low miR-150 expression. Leukemia Research; doi: 10.1016/j.leukres.2017.04.002.

IF: 2,319

Kinga Szurián, Irén Csala, Dóra Marosvári, Hajnalka Rajnai, Katalin Dezső, Csaba Bödör, Violetta Piurkó, András Matolcsy, Lilla Reiniger (2018) EZH2 is upregulated in the proliferation centers of CLL/SLL lymph nodes. Experimental and Molecular Pathology doi:10.1016/j.yexmp.

IF: 2,566

Az értekezés témáján túl:

Kinga Szurian, Karl Kashofer, Bernadette Liegl-Atzwanger (2017) Role of Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for the Evaluation of Bone and Soft-Tissue Tumors. Pathobiology; 84(6):323-338. doi: 10.1159/000478662.

IF: 1,592

Kinga Szurian, Holger Till, Eva Amerstorfer, Nicole Hinteregger, Hans-Jörg Mischinger, Bernadette Liegl-Atzwanger, Iva Brcic (2017) Rarity among benign gastric tumors: Plexiform fibromyxoma –report of two cases. World Journal of Gastroenterology; 23(31):5817-5822. doi: 10.3748/wjg.v23.i31.5817.

IF: 3,3

Edina Bugyik, Katalin Dezső, Eszter Turányi, **Kinga Szurián**, Sándor Paku, Péter Nagy (2012) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene induces substantial hyperplasia in

fibrotic mouse liver. International Journal of Experimental Pathology, doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00803.x.

IF: 2,04

Eszter Turányi, Katalin Dezső, Edina Bugyik, **Kinga Szurián**, Sándor Paku, Péter Nagy (2010) The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- β -1 inhibition. Liver international; 30(10):1505-10. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02324.x.

IF: 3,84

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Reiniger Lilla témavezetőmnek a szakmai segítség és tanítás mellett a rengeteg munkáért, a sok feláldozott hétvégéért és ünnepnapért.

Köszönöm Prof. Matolcsy Andrásnak, hogy befogadott az intézetbe, szakmai fejlődésemet éveken át támogatta és támogatja. Köszönöm, hogy befogadott a laborjába és munkámat végig segítette szakmai tanácsaival.

Köszönettel tartozom Prof. Rásó Erzsébetnek, Prof. Kovalszky Ilonának és Prof. Nagy Péternek, hogy laborjukban dolgozhattam. Köszönöm az értékes szakmai támogatást.

Köszönöm Dr. Csala Irénnek, Dr. Dezső Katának és Dr. Marosvári Dórának a közös munkát és tanítást.

Köszönettel tartozom Piurkó Violetának, Bárányné Pallag Adriennének és Kaminszky Zsuzsának, Kurucz Csillának, Tamási Annának, Hollósi Péternek és Bratu Zitának a sok segítségért.

Köszönöm Dr. Sebestyén Annának értekezésem áttanulmányozását, a hasznos észrevételeket és megjegyzéseket.

Köszönöm Dr. Bödör Csabának az értékes szakmai tanácsokat.

Köszönettel tartozom Laczik Cecíliának és Szilágyi Ilonának, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Rajnai Hajnalkának, Dr. Téglási Vandának, Dr. Csernus Balázsnak, és Dr. Székely Tamásnak az önzetlen szakmai segítségért, támogatásért és a vidám hangulatért, az együtt eltöltött munka- és szabadidőért.

Köszönöm Prof. Sápi Zoltánnak a támogatását.

Szeretném hálámat kifejezni mindazoknak, akiknek önzetlen támogatása és segítése lehetővé tette, hogy ez a munka létrejöhessen.

Köszönettel tartozom Szüleimnek és Testvéreimnek, férjemnek, Hencsei Tibornak, valamint barátaimnak, Dr. Torbágyi Péternek, Dr. Illyés Ildikónak és Dr. Gagyai Évának, akik türelmesen támogatták a munkámat.